

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Rain Hindrimäe

***Escherichia coli* ribosoomi valkude L31 ja L36 paraloogide roll
valgusünteesil**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Dr. Kalle Kipper

Dr. Aivar Liiv

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Ribosoomi üldine iseloomustus	6
1.2. Ribosoomi RNA	6
1.3. Alaühikutevahelised sillad	8
1.4. Ribosoomi valgud	9
1.5. R-valgud L31 ja L36.....	10
1.6. L31/L36 paraloogid	11
2. EKSPERIMENTAALOSA	13
2.1. Töö eesmärk.....	13
2.2. Materjal ja metoodika	14
2.2.1. Bakteritüved ja plasmiidid	14
2.2.2. T7 RNA polümeraasi ekspressioon/eraldamine	14
2.2.3. FLUC mRNA süntees	17
2.2.4. Ribosoomi alaühikute eraldamine	20
2.2.5. Aktiivsete ribosoomide hulga määramine	21
2.2.6. Alaühikute valgusünteesi võime kontrollimine polü(U) süsteemis	21
2.2.7. S12 Ekstraktide valmistamine	22
2.2.8. 70S ribosoomide hulga määramine S12 ekstraktis	22
2.2.9. Valgusünteesi kiiruse mõõtmine S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis	22
2.3. Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1. Katsesubstraatide süntees ja preparatiivne eraldamine	24
2.3.2. Aktiivsete alaühikute hulga määramine	25
2.3.3. Alaühikute valgusünteesi võime kontrollimine polü(U)-sõltuvas translatsioonisüsteemis	27
2.3.4. Valgusünteesi kiiruse mõõtmine S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis	31

KOKKUVÕTE	38
Functions of <i>Escherichia coli</i> ribosomal protein L31 and L36 paralogues in protein synthesis	39
TÄNUSÕNAD	40
KASUTATUD KIRJANDUS	41
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	44

KASUTATUD LÜHENDID

β -ME – β -Merkaptoetanool;

DTE – Ditioerütritool;

DTT – Ditiotreitool;

FLUC – *Firefly luciferase*;

NAC[^3H]Phe – radioaktiivse märgisega N-atsetüül-fenüülalaniin;

PEG-4000 – Polüetüleenglükool;

PheRS-C – Fenüülalaniin-tRNA süntetaas C;

PK – Püruvaadi kinaas;

PMSF – Fenüülmetüülsulfonüül fluoriid;

PTC – Peptidüültransferaasne tsenter;

pU – polüuridiinhape;

SD järjestus – Shine-Dalgarno järjestus;

THF – Tetrahüdrofolaat.

SISSEJUHATUS

Ribosoom on nii eel- kui ka päristuumse raku tsütoplasmas esinev kahest erineva suurusega alaühikust koosnev hiiglaslik ribonukleoproteiinkompleks, mille ülesandeks on raku valkude süntees aminohapetest. Bakteri ribosoomid koosnevad suurest 50S ja väikesest 30S alaühikust. 50S alaühik koosneb 23S rRNA-st, 5S rRNA-st ja 33-st ribosoomi valgust (L1 – L36). 30S RNA koosseisu kuulub 16S rRNA ning 21 r-valku (S1 – S21). (Wittmann 1982)

Ribosoomi valkude üheks üldiseks funktsiooniks on ribosomaalse RNA kokkupakkimise soodustamine, samuti on teada, et paljudel valkudel on ribosoomis spetsiifiline funktsioon. (Wilson ja Nierhaus 2005) Valdav osa r-valkude geenidest esinevad bakterite genoomis ühes korduses, samas mitmete bakteriliikide r-valkude L31 ja L36 geenid on duplitseerunud, st esinevad kromosoomis kahe järjestuse poolest erineva vormina. (Makarova, Ponomarev et al. 2001) Peale L31/L36 on paraloogid leitud ka valkudel S14 ja L33. R-valkude paraloogide funktsionaalsuse säilimine evolutsiooniprotsessides viitab erinevate paraloogide vajalikkusele valgusünteesiapaadis.

Bakalaureuse töö eesmärgiks on välja selgitada r-valkude L31/L36 erinevate paraloogide võimalikku mõju ribosoomi valgusünteesi võimele. Eesmärgi saavutamiseks testitakse erinevaid paralooge sisaldavaid ribosoomi kahes *in vitro* valgusünteesi süsteemis: polü(U)- ja S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Ribosoomi üldine iseloomustus

Ribosoom on nii eel- kui ka päristuumse raku tsütoplasmas esinev kahest erineva suurusega alaühikust koosnev hiiglaslik ribonukleoproteiinkompleks, mille ülesandeks on raku elutegevuseks üliolulise aineklassi – valkude – süntees aminohapetest. Aminohapete järjestuse sünteesitavas valgumolekulis määrab nukleotiidkolmikute ehk triplettide järjestus informatsioonilises RNA-s ehk mRNA-s, selle omakorda aga vastavat valku kodeeriva geeni nukleotiidne järjestus. mRNA järjestusinfo alusel läbiviidavat valgusünteesiprotsessi ribosoomis nimetatakse teaduslikus kõnepruugis translatsiooniks.

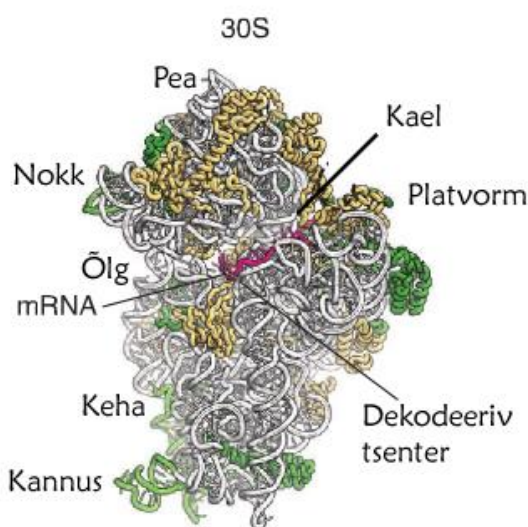
Kuigi ribosoomide ja nende alaühikute suurused eel- ja päristuumsetes organismides mõnel määral erinevad, on nende üldine ülesehitus ja funktsioneerimisviisid väga sarnased kõigis kolmes eluslooduse domeenis. Kõigis seni uuritud organismides koosnevad ribosoomid suurest ja väikesest alaühikust, mille mõõtmeid ja molekulmassi iseloomustab nn sedimentatsioonikoefitsient S. Sedimentatsioonikoefitsient iseloomustab alaüksuste liikumist tsentrifugaaljõu toimel. Bakteri ribosoomid koosnevad suurest 50S ja väikesest 30S alaühikust, mis ühinedes moodustavad 2,5 megadaltonilise 70S ribosoomi. Eukarüootsed ribosoomid sisaldavad vastavalt 60S ja 40S alaühikuid, mis kokku panduna moodustavad 80S ribosoomi. (Melnikov, Ben-Shem et al. 2012) Valgusünteesi ajal liiguvad suur ja väike alaüksus teineteise suhtes ligi 10 kraadi ulatuses, jäädes tervikuna siiski teineteisega seotuks. Selline „põrkratasliikumine“ (ingl *ratchet*) on hädavajalik ribosoomi edasiliikumiseks mRNA-l ühe koodoni võrra (Frank ja Agrawal 2000).

1.2. Ribosoomi RNA

E.coli 50S alaühik koosneb 23S rRNA-st (2900 nukleotiidi), 5S rRNA-st (120 nukleotiidi) ja 33-st ribosoomi valgust (r-valgust) (L1 – L36). 30S RNA koosseisu kuulub 16S rRNA (1500 nukleotiidi) ning 21 r-valku (S1 – S21). (Wittmann 1982)

16S rRNA jaotub sekundaarstruktuuri alusel neljaks domeeniks: 5', 3' minoorne ja 3' mašoorne domeen ning tsentraalne domeen. Tertsiaalstruktuuris moodustavad 5' domeen ja 3' minoorne domeen koos S4, S5, S12, S16, S17 ja S20 r-valkudega morfoloogiliselt eristuva 30S alaühiku keha. 3' mašoorne domeen moodustab alaühiku „pea“ S2, S3, S7, S9, S10, S13, S14 ja S19 r-valkudega ning tsentraalne domeen loob „platvormi“ interaktsioonis r-valkudega S1, S6, S8, S11, S15 ja S18. Lisaks eristuvad väiksemad morfoloogilised osad, nagu „kael“ (ingl *neck*), „kannus“ (*spur*), „õlg“ (*shoulder*) ja „nokk“ (*beak*) (joonis 1). mRNA ning kolm

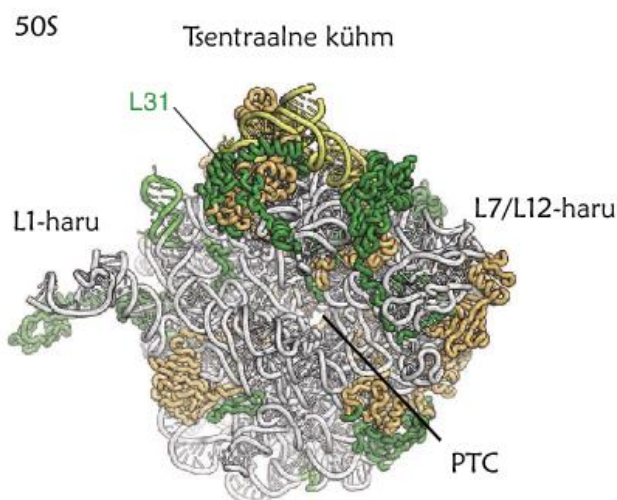
tRNA sidumissaiti (A, P ja E) asuvad alaühikute kokkupuutepinnal. mRNA siseneb läbi „pea“ ja „õla“ vahelise tunneli ning keerdub ümber 30S alaühiku „kaela“. mRNA eraldussait asub „pea“ ja „platvormi“ vahel. Väikese alaühiku dekodeeriv tsenter, kus koodon ja antikoodon paarduvad, asub kokkupuutepinnal ning on moodustunud alaühiku „peast“, „õlast“ ja 16S rRNA heeliksist 44. 30S alaühik seondub mRNA-ga startkoodonist 5'-pool asuva Shine-Dalgarno (SD) järjestuse abil. 16S rRNA 3' otsas asub SD järjestusele komplementaarne järjestus, mis tagab startkoodoni õige paigutuse väikse alaühiku P-saidi suhtes, kuhu valgusünteesi initsiatsioonifaasis seondub initsiatseeriv tRNA. (Wimberly, Brodersen et al. 2000, Melnikov, Ben-Shem et al. 2012)



Joonis 1. 30S alaühiku struktuur suurema alaühiku poolt vaadatuna. Üldine ribosoomi tuumik on näidatud valge (rRNA) ja kollasega (r-valgud), rohelisega on näidatud prokarüootide iseloomulikud fragmendid. Tertsiaaltstruktuuril on välja toodud morfoloogiliselt eristuvad osad ning mRNA ja dekodeeriva tsentri asukoht. Kohandatud artiklist (Melnikov, Ben-Shem et al. 2012).

rRNA suur alaühik (50S) jaotub sekundaarstruktuuri alusel seitsmeks domeeniks (sh S5 rRNA kui domeen VII), mis on keerukalt läbi põimunud nii r-valkudega kui ka enda osadega, moodustades kompaktse poolkera kujulise tertsiaalstruktuuri (joonis 2) (Ban, Nissen et al. 2000). Tertsiaalstruktuuris eristuvad kolm jätket: tsentraalne kühm, L1-haru ja L7/L12-haru. 50S alaühiku poolisel kokkupuutepinnal asuvad tRNA sidumissaidid A, P ja E ning peptidüültransferaasne tsenter (PTC), kus toimub ribosoomi poolt katalüüsitud peptiidsideme moodustumine. PTC-st saab alguse 50S partiklit läbiv polüpeptiidi väljumistunnel, mida

mööda väljub ribosoomist kasvav polüpeptiid. Tunneli seinad on moodustunud konserveerunud 23S rRNA osadest ja L4, L22 ning L23 r-valkudest. (Wimberly, Brodersen et al. 2000, Melnikov, Ben-Shem et al. 2012)



Joonis 2. 50S alaühiku struktuur väiksema alaühiku poolt vaadatuna. Üldine ribosoomi tuumik on näidatud valge (rRNA) ja kollasega (r-valgud), rohelisega on näidatud prokarüoodile iseloomulikud fragmendid. Tertsiaaltstruktuuril on välja toodud morfoloogiliselt eristuvad osad ning peptidüültransferaasne tsenter (PTC). Kohandatud artiklist (Melnikov, Ben-Shem et al. 2012).

1.3. Alaühikutevahelised sillad

Krüo-elektronmikroskoopia uuringutega ja röntgendifraktsioonanalüüsi andmetel hoiavad alaühikuid transleerivas ribosoomis koos 15 alaühikutevahelist silda, mis sisaldavad osasid nii suurest kui väikesest alaüksusest (Shasmal, Chakraborty et al. 2010). *T.thermophilus* ja *E.coli* kõrgresolutsioon struktuuranalüüs näitas kaheksa erineva silla olemasolu (B1a, B1b, B2a, B2b, B2c, B3, B4, B5, B6, B7a, B7b ja B8). Samuti näidati *T.thermophiluse* puhul rRNA ning r-valkude jääkide seotust sildade formeerumisel. (Yusupov, Yusupova et al. 2001, Gao, Sengupta et al. 2003) Sildade seas on eristatavad RNA-RNA, RNA-valk ja valk-valk sillad. Enamik RNA-RNA sildu paikneb alaüksuste kokkupuutepinna keskosas, valgulise komponendiga sillad aga kokkupuutepinna perifeerias, sidudes suure alaüksuse tsentraalse kühmu ja väikese alaüksuse „pea“ piirkonda. (Yusupov, Yusupova et al. 2001) Struktuuri ja biokeemiliste andmete põhjal võib väita, et erinevad alaühikutevahelised sillad omavad valgu translatsioonil funktsionaalset ja dünaamilist rolli (Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005).

Nelikümmend aastat tagasi tuldi välja ideega, et tRNA ja mRNA translokatsioon valgusünteesi käigus on seotud struktuursete muutustega ribosoomis (Spirin 1968). Ribosoomi komplekside krüo-elektronmikroskoopia uuringud näitasid valgusünteesi ajal suure ja väikese alaühiku ligi 10 kraadist liikumist (*ratchet*-laadne liikumine) teineteise suhtes, jäädes tervikuna siiski teineteisega seotuks (Frank ja Agrawal 2000). Ka biokeemiliselt kinnitati alaühikute *ratchet*-laadse liikumise nõuet (Horan ja Noller 2007). Seniste teadmiste kohaselt on tsentraalsed RNA-RNA sillad alaüksuste *ratchet*-liikumise ajal stabiilsed, perifeersed sillad aga lagunevad ja korralduvad selle protsessi käigus ümber. (Shasmal, Chakraborty et al. 2010) Sildade selline erinev stabiilsus võib olla seotud mRNA translokatsiooniga, sest just perifeersed sillad paiknevad mRNA seondumiskoha läheduses. Ainus valk-valk sild B1b, mis moodustub valkude S13 ja L5 ühinemisel, omab suurimat osa *ratchet*-laadsel liikumisel, mil silla valgud reorganiseeruvad ribosoomi liikumise ajal erinevatesse konstellatsioonidesse. B1b peab alaühikute *ratchet*-laadse liikumise tõttu perioodiliselt läbima suuri struktuurseid muutusi. (Cukras ja Green 2005)

Algselt on silla B1b komponentideks peetud ainult valke S13 ja L5, kuna *E. coli* ei suudetud r-valku L31 detekteerida. Samas on T. Thermophiluse kristallstruktuuridel selgelt näha r-valk L31, mis moodustab ühendava lüli S13 ja L5 vahel, omades võrdselt kontakte nii 30S kui ka 50S alaühikuga. Lähtudes sellest kasutati in silico modelleerist ennustamaks L31 asukohta *E.coli* 70S ribosoomis. Selgus, et sarnaselt T.thermophiluse ribosoomiga, võiks L31 *E.coli* ribosoomis paikneda samas piirkonnas ja olla kontaktis nii L5 kui ka S13 valguga, osaledes aktiivselt silla B1b moodustumises ja dünaamikas. (Shasmal, Chakraborty et al. 2010)

1.4. Ribosoomi valgud

Ribosoomi valgud on olulised ribosoomi optimaalseks funktsioneerimiseks ja kokkupanekuks (ingl *assembly*). *E.coli* ribosoomis on 21 väikese alaühiku valku (S1 – S21) ning 33 suure alaühiku valku (L1 – L36). (Wilson ja Nierhaus 2005) Tähed vastavad alaühiku suurusele, milles antud valk paikneb (S – small, L – large), numbrid tulenevad valkude liikuvusest 2D-polüakrüülamiid geelil, mis sõltub nii valgumolekuli molekulmassist kui ka elektrilistest omadustest. Suurtel happelistel valkudel on väike number ja väikestel aluselistel suur number. Kõiki r-valke on ribosoomis ühes korduses, välja arvatud L7 ja L12, mis koos L10-ga moodustavad pentameerse kompleksi L10 x (L7/L12)₄. Füsioloogiliste tingimuste juures on ribosoomi valgud valdavalt positiivse kogulaenguga – see võimaldab neil seonduda negatiivselt laetud ribosoomi RNA-ga. Erandiks on rRNA-ga vahetult mittekontakteeruvad valgud L7 ja L12, mis omavad negatiivset kogulaengut. (Wilson ja Nierhaus 2005)

R-valgud on ebavõrdselt üle ribosoomi jaotunud. Väikeses alaühikus asub ainult S12 perifeerias, ülejäänud tsütoplasmaatilisel poolel. Enamik väikese alaühiku S-valke interakteeruvad 16S rRNA 3' mašoorse domeeniga. Seevastu funktsionaalselt tähtsa 3' minoorse domeeniga, mis sisaldab dekodeeriva tsentri A-saiti ja anti-SD järjestust, ei interakteeru peaaegu ükski valk, välja arvatud S12. 50S alaühiku poolne kokkupuutepind on samuti valgugaene, seevastu aga mRNA sisenemissait, translatsioonifaktorite seondumissait ning tunneli väljapääs on valgurikkad piirkonnad. (Wilson ja Nierhaus 2005)

Ribosoomi valkude üheks üldiseks funktsiooniks on ribosomaalse RNA kokkupakkimise soodustamine, kuna positiivse laenguga r-valgud varjestavad rRNA suhkur-fosfaat selgroo negatiivset laengut. Alaühiku kokkupanekul osalevad väikese alaühiku valgud on tavaliselt globulaarsed ja seonduvad mitmeharuliste ühenduskohtadega, et fikseerida regiooni konformatsioon ja tuua ruumiliselt lähestikku sekundaarstruktuuril üksteisest kaugel paiknevad rRNA piirkonnad. (Wilson ja Nierhaus 2005) Näiteks 30S alaühiku kokkupaneku initsiaatorvalk S4 seondub 5' domeeni 5-suunalise ühenduskohaga, suures alaühikus seondub L3 domeenidega II – VI. Mõnel r-valgul on kindel funktsioon ribosoomide alaühikute kokkupanekul, aga see funktsioon muutub mittevajalikuks pärast ribonukleoproteiini partikli moodustumist. Sellised valgud võivad jääda partiklisse stabiliseerima tekkinud ribosoomi, näiteks r-valgud S16, L15, L16, L20 ja L24. Kuigi üldine valkude tähtsus on ebaselge, on siiski teada, et paljudel valkudel on spetsiifiline funktsioon ribosoomis. (Wilson ja Nierhaus 2005)

Prokarüootides on r-valkude geenid organiseeritud polütsistronsetesse operonidesse. Et ribosoomi komponentide biosünteesil on oluline hoida r-valkude ja rRNA moolsuhet 1 : 1 lähedal, on r-valkude operonide transkriptsioon allutatud, toimib nn *feedback*-regulatsioon. R-valk, mis kodeeritakse polütsistronse mRNA-lt, seondub esimesele initsiatsioonisaidile mRNA-l ja hoiab ära terve mRNA transleerimise. Selline translatsiooni regulatsioon on näidatud valkudel S1 (S1 operon), S2 (S2 operon), S4 (alfa operon), S7 (*str* operon), S8 (*spc* operon), S15 (S15 operon), S20 (S20 operon), L1 (L11 operon), L4 (S10 operon), L10 ja L12 (L10 operon) ning L20 (*thrS/L20/pheS* operon) (Wilson ja Nierhaus 2005).

1.5. R-valgud L31 ja L36

R-valk L31 koosneb 70 aminohapest, asub suure alaühiku tsentraalsel kühmul, moodustab dimeeri valguga L5 ja omab N-terminaalses regioonis, positsioonidel 11-35 β -leht struktuuri. Kuigi L31 on suure alaühiku valk, siis transleerivas ribosoomis ulatub valgu C-terminaalne ots väikese alaühiku peani ning interakteerub valkudega S13 ja S19. Struktuuride *in silico*

analüüsi andmed toetavad mudelit, kus ribosomaalne valk L31 omab rolli 30S alaühiku „pea“ domeeni pöörlemise ulatuse määramises translokatsiooniprotsessis (Shasmal, Chakraborty et al. 2010).

R-valk L36 on kõige väiksem prokarüootne ribosomaalne valk, koosnedes 38-st aminohappest. Sel on tsink-lindi-taoline struktuur, kuhu kuulub väike β -leht sekundaarstruktuur. R-valk L36 on tugevalt aluseline. (Härd, Rak et al. 2000) Valk on konserveerunud bakteristes, mitokondrites ja kloroplastides, kuid puudub täielikult arhede ning eukarüootide genoomis. (Cummings, Riley et al. 2002) Valk on ümbritsetud mitmete konserveerunud funktsionaalsete 23S rRNA regioonidega ja paikneb kahe sümmeetriliselt seotud regiooni vahel, mis ulatuvad peptidüültransferaasest tsentrist välja. Ribosoomide DMS ja hüdroksüülradikaal proovimise andmete põhjal võib arvata, et L36 stabiliseerib 23S RNA ruumilist struktuuri. On võimalik, et L36 stabiliseeriva toime aluseks on ribosoomi tertsiaarstruktuuri RNA-RNA kontaktide läheduses olevate nukleotiidide reaktiivsuste muutmine. Valgu L36 puudumine toob kaasa 40 – 50 % rakukasvu aeglustumise 30 – 42 °C juures. (Maeder ja Draper 2005)

1.6. L31/L36 paraloogid

Erinevalt valdavast osast prokarüootide r-valkudest, millede geenid esinevad bakterite genoomis ühes korduses, on mitmete bakteriliikide r-valkude L31 ja L36 geenid duplitseerunud, st esinevad kromosoomis kahe järjestuse poolest erineva vormina. (Makarova, Ponomarev et al. 2001) Selliseid algse eellasgeeni duplitseerumise tulemusena tekkinud geenivorme nimetatakse paraloogideks. Peale L31/L36 on paraloogid leitud ka valkudel S14 ja L33. R-valkude L31/L33/L36/S14 ning vastavate paraloogide kõige olulisemaks erinevuseks on motiivi CxxC olemasolu valkudes (A variant) ning puudumine paraloogides (B variant). (Makarova, Ponomarev et al. 2001)

Kui valku L31 kodeerib *E.coli* geen *rpmE*, siis selle paraloogi, L31B-d kodeerib geen *ykgM*. Motiivi CxxC vahendusel seotakse üks ekvivalentühik Zn^{2+} , sama motiivi puudumisel Zn^{2+} ei seota. See viitab võimalusele, et paraloogil B on roll tsingi ainevahetuses. Paraloogi L31B seotust tsingi ainevahetusega toetab ka tähelepanek, et L31B geen *ykgM* kuulub operoni *ykgMO*, mille ekspressioon sõltub kasvukeskkonna Zn^{2+} kontsentratsioonist. Valku L31B ekspresseeritakse madala Zn^{2+} sisalduse korral, kui transkriptsiooni repressor vabaneb DNA-lt. (Makarova, Ponomarev et al. 2001)

B.subtilise puhul on L31 paraloog B geeniks *ytiA*, mille ekspressioon on Zur repressori negatiivse kontrolli all. Zur on tsink-spetsiifiline transkriptsiooni repressor, mis kontrollib

tsingi transpordis osalevate valkude operone. *ytjA* geen omab Zur-seonduvat motiivi, kuhu repressor seondub, kui kasvukeskkonnas on Zn^{2+} piisavalt. Madala Zn^{2+} sisalduse korral ei seonu Zn^{2+} CxxC motiivile, RpmE (L31A) muutub rakus ebastabiilseks ning *ytjA* geeniekspressiooni ei repressseerita. L31A asemel alustatakse tema paralooži (L31B) kodeerimisega, mis lülitub ribosoomi koosseisu. (Nanamiya, Kawamura et al. 2006)

R-valku L36A kodeeritakse geenilt *rpmJ*, paralooži L36B geenilt *ykgO*, mis kuulub operoni *ykgMO*. Seega ekspresseeritakse valku L36B ainult Zn^{2+} limitatsioonil ning sarnaselt L31B-le, puudub ka L36B valgus CxxC motiiv. (Makarova, Ponomarev et al. 2001)

Zn^{2+} seondumist on näidatud *T.thermophilus* ka S14 puhul, samuti on genoomi uuringud näidanud, et paljudes bakteri genoomides omavad 7 bakteriaalset ribosoomi valku (L36, L33, L32, L31, L28, S14 ja S18) CxxC motiivi, millele Zn^{2+} seondub. (Härd, Rak et al. 2000, Makarova, Ponomarev et al. 2001) Selle põhjal võib arvata, et tsink on ribosoomi funktsioneerimiseks vajalik, vähemalt teatud ajal, kõigis elusorganismides.

Valkude L31/L36 paraloožide rolli ribosoomi funktsioneerimisel on eelnevalt uuritud TÜ LOMRI Molekulaarbioloogia laboris. *Escherichia coli* 70S ribosoomide valgulise koostise kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks analüüsimiseks rakendati Triin Tammsalu magistritöös MS-põhinevat proteoomika meetodit SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in a cell culture*) (Ong, Blagoev et al. 2002). SILAC strateegias lülitatakse valkude biosünteesil paralleelsete rakukultuuride proteoomi erinevaid stabiilsete isotoopidega märgistatud aminohapete analooge, mille alusel määratakse valkude suhtelised kogused vastavate paralleelkultuuride vahel. R-valkude L31 ja L36 paraloožide esinemise kohta ribosoomides leiti, et raku üleminekul statsionaarsesse kasvufaasi suureneb L31B hulk esimese kuue tunni jooksul 9 korda ning järgneva 60 tunni jooksul veel 2 korda. Samuti suureneb ka L31 ning L36 hulk. Statsionaarses faasis väheneb Zn^{2+} limitatsiooni korral 48 tunni möödudes L31 hulk ligi kuus korda ning suureneb L31B ning L36B valkude hulk. $ZnSO_4$ lisamisel rakukultuuri ei lülitata ribosoomide hulka enam L31B ega L36B valke ning L31 koopiaarv 48 tunni möödudes püsib muutumatuna. Zn^{2+} surub transkriptsiooni tasemel L31B/L36B ekspresiooni maha. Samas statsionaarses faasis ekspresseerub L31B/L36B ka Zn^{2+} juuresolekul. L31B suudab juba olemasolevatest ribosoomidest L31A välja tõrjuda. L36B seda ei suuda, tema lülitatakse alles värskest sünteesitud ribosoomidesse.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas r-valgu L31/L36 A või B paraloogi esinemine ribosoomi koostises vahendab muutusi keskkonnatingimustes valgusünteesiapaadile. Lähtuvalt sellest püstitati tööhüpotees, mille kohaselt valgusünteesi kiirus sõltub sellest, millist L31 ja/või L36 valguparaloogi ribosoom sisaldab.

Hüpoteesi testimiseks viidi läbi katseseeriad, milles analüüsti erinevaid L31 ja L36 paralooge sisaldavate ribosoomipopulatsioonide valgusünteesivõimet *in vitro*, kasutades polü(U)-sõltuvat translatsioonisüsteemi ja S12-sõltuvat translatsioonisüsteemi.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Bakteritüved ja plasmiidid

Eksperimentide läbiviimiseks kasutati järgnevaid *Escherichia coli* tüvesid:

1. Δ L36A tüvi JW3261 (Δ (araD-araB)567, Δ lacZ4787(::rrnB-3), λ^- , Δ rpmJ731::kan, rph-1, Δ (rhaD-rhaB)568, hsdR514; Baba et al., 2006);
2. Δ L31B tüvi JW5035 (Δ (araD-araB)567, Δ ykgM742::kan, Δ lacZ4787(::rrnB-3), λ^- , rph-1, Δ (rhaD-rhaB)568, hsdR514; Baba et al., 2006);
3. Δ L31A tüvi JW3907 (Δ (araD-araB)567, Δ lacZ4787(::rrnB-3), λ^- , rph-1, Δ (rhaD-rhaB)568, Δ rpmE723::kan, hsdR514; Baba et al., 2006);
4. Δ L36B tüvi JW5034 (Δ (araD-araB)567, Δ ykgM741::kan, Δ lacZ4787(::rrnB-3), λ^- , rph-1, Δ (rhaD-rhaB)568, hsdR514; Baba et al., 2006).
5. BW25113(Δ (araD-araB)567, Δ lacZ4787(::rrnB-3), λ^- , rph-1, Δ (rhaD-rhaB)568, hsdR514; Datsenko ja Wanner, 2000);
6. BL21(DE3) (F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]);
7. BL21(DE3)-pQET7RNAP [BL21(DE3) mis sisaldab T7RNAP üleekspressiooniplasmiidi].

Ekspressiooni plasmiididena kasutati järgnevaid plasmiide:

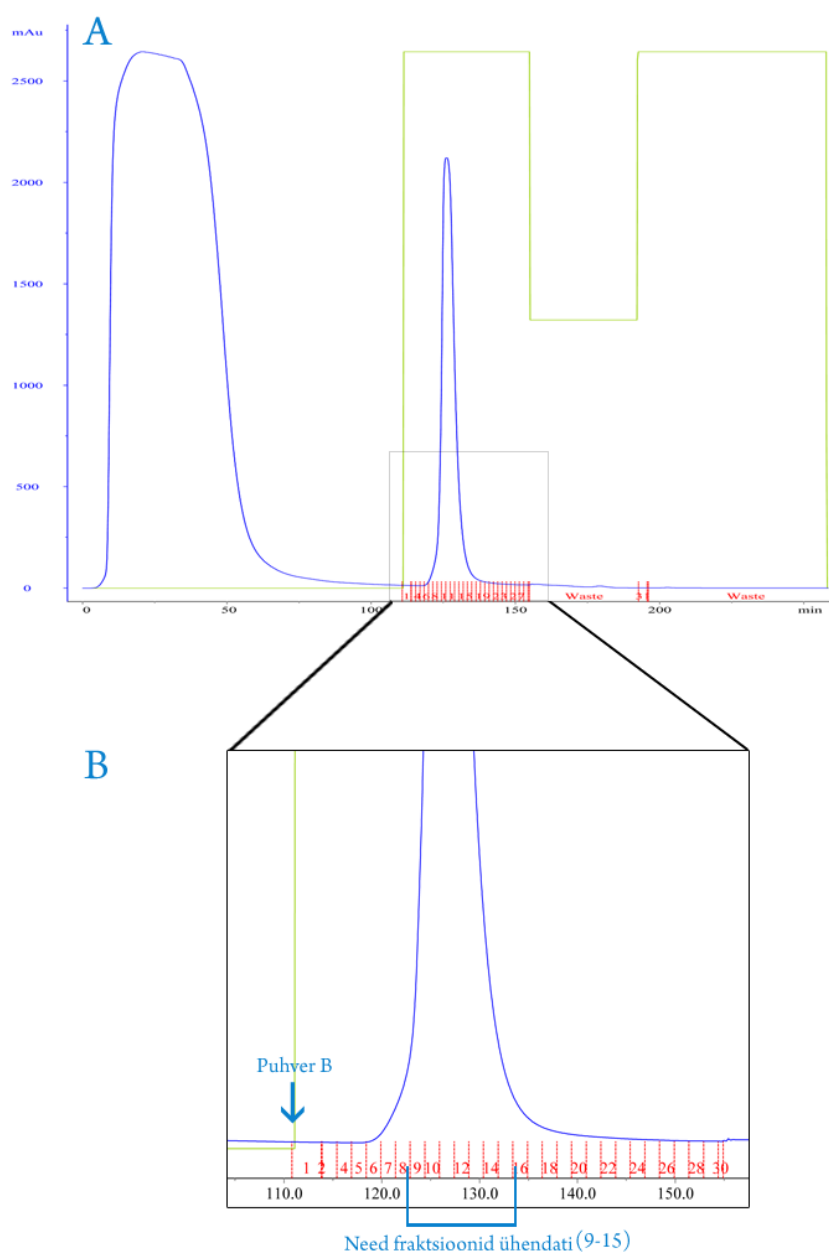
1. pQE30-T7RNAP: T7 RNA polümeraasi üleekspressiooni plasmiid [pQE30 (QIAGEN), millesse on sisse viidud T7RNAP geen];
2. pIVEX2.3-MCS: *firefly luciferase*'i (FLUC) mRNA järjestust sisaldav plasmiid (FLUC geen on T7RNAP kontrolli all; saadud kingitusena dr. V. Hauryliuk'lt).

2.2.2. T7 RNA polümeraasi ekspressioon/eraldamine

T7 RNA polümeraasi (T7RNAP) ekspressiooniks kasutati *E.coli* tüve BL21DE3-pQE30-T7RNAP. 6 x 2 ml 2x YT-s (+ 100 µg/ml Amp, 50 µg/ml Km) kasvatatud üleöö kultuuriga inokuleeriti 2 l 2x YT söödet (+ 100 µg/ml Amp, 50 µg/ml Km). OD_{A600} oli vahetult peale inokuleerimist 0,031. Kultuur kasvatati loksutitel (180 rpm) 30° C juures OD_{A600} 1,3-ni, seejärel lisati igale kultuurile IPTG-d lõppkontsentratsioonis 1 mM. Rakukultuuril lasti kasvada OD_{A600} 4-ni (kulus 4 h). Rakumass koguti tsentrifugimise teel 10 min 4000 rpm

ROTINA lauatsentrifuugis, külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati edasiseks kasutamiseks -80° C juures.

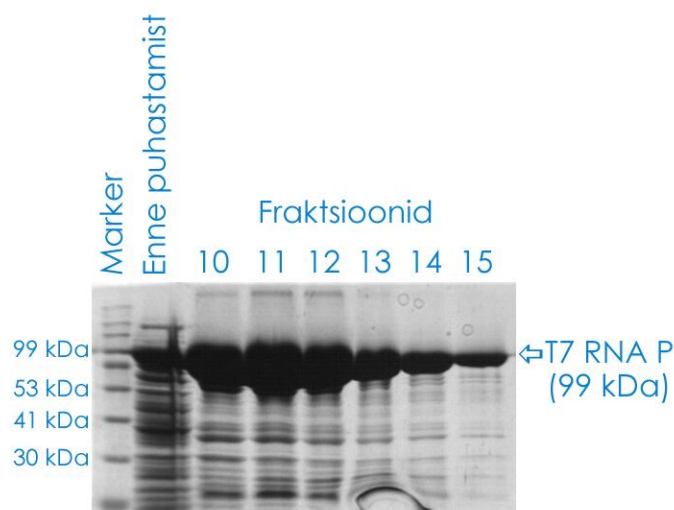
T7RNAP eraldamiseks suspendeeriti rakumass (ca 4 – 5 g) 50 ml puhvris A (50 mM NaH₂PO₄; 1 M NaCl; 20 mM imidasool, pH 7,4) kuhu lisati PMSF lõppkontsentratsioon 0,2 mM, DNAas I 20 U/ml ja lüsotsüüm (Amresco) 3 mg/ml. Rakususpensioon segati 15 minutit „end-over-end“ segajal 4° C juures ning lüüsi seejärel „Bertin Technologies“ „Precellys 24“ homogenisaatoris (programm: 6000 rpm, 3 x 60 s, 10 s paus protseduuride vahel). Polümeraas eraldati afiinsus kromatograafiliselt, kasutades Ni-SepharoseTM 6 Fast Flow (GE Healthcare) kolonni ja ÄKTA-PRIME/Primeview kromatograafiasüsteemi (kolonni mõõtmed: läbimõõt 1,7 cm; kõrgus 9 cm; ruumala 20,4 cm²; voolutuskiirus 1 ml/min). Kolonnile seondunud valk elueeriti puhvriga B (50 mM NaH₂PO₄; 1 M NaCl; 500 mM imidasool, pH 7,4; fraktsiooni ruumala – 1,5 ml). (joonis 3)



Joonis 3. T7RNAP puhastamise kromatogramm. Valk puhastati Ni-SepharoseTM 6 Fast Flow kolonnis (GE Healthcare) kasutades ÄKTA-PRIME/Primeview süsteemi. Joonisel on sinise noolega tähistatud B puhvri (50 mM NaH₂PO₄; 1 M NaCl; 500 mM imidasool, pH 7,4) kolonnile kandmine. Punasega on märgitud fraktsioonid. Fraktsioone 9-15 analüüsiti SDS-PAAG elektroforeesil.

Fraktsioonidest 10 – 15 (joonis 3) võeti 10 µl proovi ja kanti 10 % PAAG/SDS geelile kontrollimaks T7RNAP olemasolu. Fraktsioonid 9 – 15 sisaldasid valku, mille liikuvus vastas ligikaudu T7RNAP liikuvusele (Mw = 99 kDa) (joonis 4). T7RNAP sisaldavad fraktsioonid ühendati ja kanti puhvrivahetuseks ning sellele järgnevas kontsentreerimiseks AMICON-i 30

000 Da läbilaskvuspiiriga tsentrifugaalfiltrile. Puhvrivahetuse käigus asendati elueerimispuhver 10 ml ensüümi säilituspuhvriga (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM KCl; 2 mM Mg(OAc)₂). Filtrit tsentrifuugiti ROTINA lauatsentrifuugis 3500 x g, kuni filtrile oli jäänud u 0,5 ml retentaati. Retentaat klaariti 13 000 rpm/15 min ja supernatandile lisati võrdne kogus ensüümi säilituspuhtrit (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM KCl; 2 mM Mg(OAc)₂; 40 % (v/v)) glütserooli H₂O-s. Preparatsioon jaotati 100 µl kauapa laiali, külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80° C juures.



Joonis 4 T7RNAP eraldamine afiinsus kromatograafia meetodil. Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow kolonnilt elueerunud valgu kontroll fraktsioonidest 10 – 15 10 % PAAG/SDS geelil. Geelile kanti 10 µl proovi fraktsioonidest 10 – 15 (joonis 3) ning 10 µl võeti lüsaadist vahetult enne puhastamist. Markeriks oli Protein Ladder Blue Prestained 10-245 kDa.

2.2.3. FLUC mRNA süntees

S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis kasutatava reportervalgu sünteesiks kasutati *Photinus pyralis*-e ensüümi lutsiferaas kodeerivat mRNA-d (ingl *Firefly luciferase*; *FLUC*). FLUC mRNA transkribeeriti *in vitro* T7 polümeraasi transkriptsioonisüsteemis.

FLUC geeni DNA matriits *in vitro* transkriptsiooni jaoks amplifitseeriti pIVEX2.3-MCS konstruktist PCR meetodiga, kasutades FLUC geeniga külgnevate piirkondade suhtes komplementaarseid praimereid. Geen on konstruktis sisestatud T7 polümeraasi promootor- ja terminaatorjärjestuse vahele. (joonis 5) FLUC geeni pikkuseks on 1652 aluspaari. PCR reaktsioonisegu mahuks oli 2 ml ja see koosnes järgmistest komponentidest: 2,5 µg pIVEX2.3-MCS konstrukt; 0,2 mM dNTP; 800 pmol praimer T7F; 800 pmol praimer T7

TERM; 1x PCR puhver (75 mM Tris pH 8,8; 20 mM NH₂SO₄; 0,01 % TritonX 100; 0,5 % Ficoll 400; 1 mM tartasiin); 2,5 mM MgCl₂; 200 U Pfu/Taq polümeraaside segu suhtes 4 : 1. PCR reaktsioon koosnes viiest etapist (tabel 1).

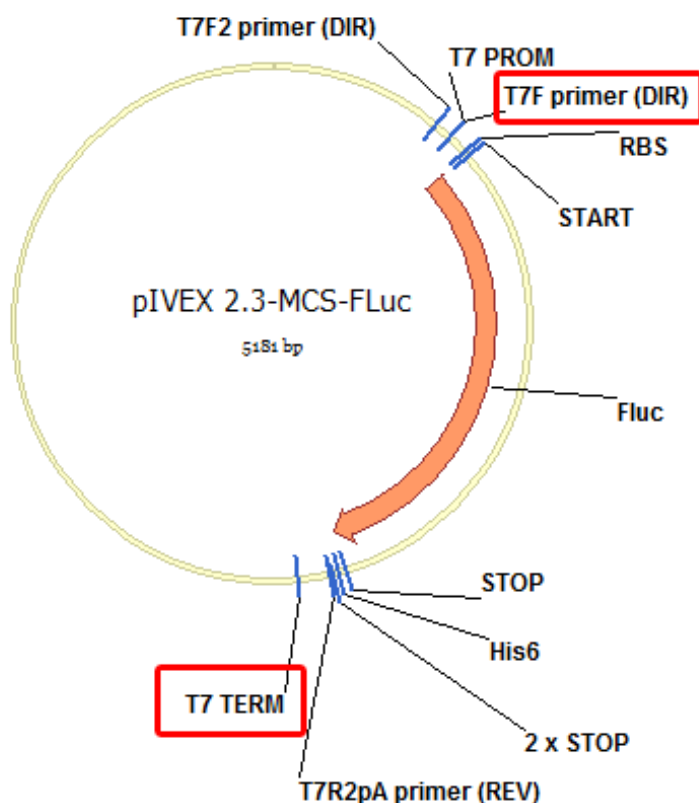
Praimeritena kasutati järgmisi oligonukleotide:

T7F: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

T7 TERM: 5' TAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTT 3'

Tabel 1. FLUC DNA järjestuse amplifikatsioon PCR meetodil.

Esialgne denaturatsioon	94° C 3 min	32x
Denaturatsioon kõigis järgnevatel etappidel	94° C 30 s	
Praimeri seondumine	56° C 40 s	
DNA süntees	72° C 3 min	
DNA täiendav süntees	72° C 7 min	



Joonis 5. FLUC geen pIVEX 2.3-MCS konstruktis. Noolega on näidatud FLUC geeni asukoht, punaste kastitega on märgitud praimerid, millega geen amplifitseeriti. PCR produkti pikkuseks on 1902 aluspaari.

FLUC geeni DNA matriitsile tehti fenool/kloroform töötlus. PCR segu tsentrifuugiti Biofuge Fresco lauatsentrifuugis 10 min 13 000 rpm. Supernatant eraldati klaastuubi, kuhu lisati üks maht (v/v) fenooli (pH 8). Segu segati intensiivselt keeristil ning orgaaniline ja vesifaas lahutati Biofuge Fresco lauatsentrifuugis tsentrifuugides 10 min 13 000 rpm. Vesifaas eraldati puhtasse klaastuubi, kuhu lisati NaOAc (pH 4,62) lõppkontsentratsioon 0,35 M. Vesifaasi lisati võrdses mahus kloroformi, segati keeristil ja tsentrifuugiti Biofuge Fresco lauatsentrifuugis 10 min 13 000 rpm. Vesifaas eraldati puhtasse klaastuubi, kuhu lisati kolm mahtu 96 % etanooli DNA sadestamiseks. DNA sadenes -21° C juures 20 min. DNA-sool kompleks tsentrifuugiti Biofuge Fresco lauatsentrifuugis 25 min 6000 rpm. Supernatant aspireeriti, DNA-sool kompleks pesti 70 % etanooliga ning tsentrifuugiti Biofuge Fresco lauatsentrifuugis 25 min 6000 rpm. Etanool aspireeriti sademelt, proov kuivatati ning DNA lahustati ddH₂O-s. DNA kontsentratsiooniks mõõdeti Nanodrop spektrofotomeetriga 4,3 µg/µl. Reaktsioonisaagis oli 688 µg FLUC DNA-d.

In vitro transkriptsioon viidi läbi 2,5 ml-s reaktsioonisegus, mis koosnes järgmistest komponentidest: 4 mM rNTP; 1x transkriptsiooni puhver (200 mM Hepes pH 7,6; 30 mM MgCl₂; 30 mM DTE; 2 mM spermidiin); 200 U Ribolock RNAasi inhibiitorit; 25 U/µl T7 RNA polümeraas; 86 µg DNA matriits (FLUC,). Reaktsioonisegu inkubeeriti 1,5 tundi 37° C juures. Reaktsioon lõpetati 800 U DNAas I lisamisega ja inkubeeriti 20 min 37° C. Reaktsioonisegu tsentrifuugiti Biofuge Fresco lauatsentrifuugis 10 min 13 000 rpm. Supernatant eraldati klaastuubi, kuhu lisati üks maht (v/v) fenooli (pH 5,5). Segu segati intensiivselt keeristil ning orgaaniline ja vesifaas lahutati Biofuge Fresco lauatsentrifuugis tsentrifuugides 10 min 13 000 rpm. Vesifaas eraldati puhtasse klaastuubi, kuhu lisati NaOAc (pH 4,62) lõppkontsentratsioon 0,35 M. Vesifaasi lisati võrdses mahus kloroformi, segati keeristil ja tsentrifuugiti Biofuge Fresco lauatsentrifuugis 10 min 13 000 rpm. Vesifaas eraldati puhtasse klaastuubi, kuhu lisati kolm mahtu 96 % etanooli RNA sadestamiseks. RNA sadenes -21° C juures 20 min. RNA-sool kompleks tsentrifuugiti Biofuge Fresco lauatsentrifuugis 25 min 6000 rpm. Supernatant aspireeriti, RNA-sool kompleks pesti 70 % etanooliga ning tsentrifuugiti Biofuge Fresco lauatsentrifuugis 25 min 6000 rpm. Etanool aspireeriti sademelt, proov kuivatati ning RNA lahustati ddH₂O-s. RNA kontsentratsiooniks

mõõdeti Nanodrop spektrofotomeetriga 16,6 µg/µl. Reaktsioonisaagis oli 6,64 mg funktsionaalset mRNA-d.

2.2.4. Ribosoomi alaühikute eraldamine

Ribosoomi alaühikud eraldati *E.coli* tüvedest BW25113 (metsiktüvi), JW3907 L31A⁻, JW5035 L31B⁻, JW3261 L36A⁻ ning JW5034 L36B⁻. Üleöö kasvatatud kultuuridega (2 ml 2x YT) inokuleeriti 2 l 2x YT söödet (iga tüve kohta; + 3,04 g/l NaH₂PO₄; 10,73 g/l Na₂HPO₄; 18 g/l glükoos). OD_{A600} oli vahetult pärast inokuleerimist vahemikus 0,02 – 0,035. Rakud kasvatati 37° C loksutitel kuni OD_{A600} 2-ni, seejärel koguti rakumass põhja ROTINA lauatsentrifuugis 12 min 4000 rpm. Sööde aspireeriti ning söötmejääkide eemaldamiseks suspendeeriti rakumassid 40 ml-s 1x Overlay-1 puhvril (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM Mg(OAc)₂; 60 mM NH₄Cl) ja tsentrifuugiti ROTINA lauatsentrifuugis 12 min 4500 rpm. Supernatant aspireeriti ning rakumassid resuspendeeriti 20 ml lõppmahuga lüüsipuhvril (1x Overlay-1; 2 mg/ml lüütsüüm (Amresco); 20U/ml DNAas I). Suspensioonid segati 20 min 4° C juures „end-over-end“ segajal. Rakumassid lüüsi „Bertin Technologies“ „Precellys 24“ homogenisaatoris (programm: 6000 rpm; 3 x 60 s; 10 s paus protseduuride vahel). Lüsaadid klaariti lauatsentrifuugis 20 min 17 000 rpm. Supernatandid (20 ml) eraldati uutesse tuubidesse ning ruumalad viidi 1x Overlay-1 puhvriga 30 ml-ni.

Supernatandid kanti ribosoomide eraldamiseks 30 ml 20 % sahharoosipatjadele [20% deioniseeritud sahharoos; 1x Overlay-10 (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM Mg(OAc)₂; 60 mM NH₄Cl)] Ti-45 tuubides. Proovid tsentrifuugiti ultratsentrifuugis Ti-45 rootoriga järgmistel tingimustel (tabel 2):

Tabel 2. Ribosoomide eraldamise tingimused 20 % sahharoosipatjadel Ti-45 rootoriga.

ω^2t	8,00 x 10 ¹¹ rad ² /s
Kiirus	36 000 rpm
T°	4° C

Supernatandid aspireeriti, sademed pesti ettevaatlikult 10 ml-s 1x Overlay-1 puhvriga. Pesulahused aspireeriti ja sade lahustati 45 ml-s 1x Overlay-1 puhvril jään loksutades. Lahused klaariti Ti-50 rootoriga tsentrifuugides 20 min 16 000 rpm. Supernatandid eraldati uutesse tuubidesse. Supernatantidele lisati 5 ml 50 % sahharoosi lahust (50 % deioniseeritud sahharoos, 1x Overlay-1) ja kanti 10 – 25 % sahharoosi gradiendile. Gradiendid tsentrifuugiti ultratsentrifuugis Ti-14 rootoriga $\omega^2t = 4,5 \times 10^{11}$ rad²/s, 4° C. Gradiendid analüüsiti

foto meetriga UVICORD. 30S ja 50S fraktsioonid koguti kokku, Mg tase viidi 20 mM-ni ning alaühikud tsentrifuugiti põhja ultratsentrifuugis $\omega^2 t = 1,3 \times 10^{12} \text{ rad}^2/\text{s}$, 4° C. Supernatant aspireeriti ning 30S ja 50S alaühikud suspendeeriti 1x Overlay-10 (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM Mg(OAc)₂; 60 mM NH₄Cl) + 6 mM β -ME puhvris.

2.2.5. Aktiivsete ribosoomide hulga määramine

Aktiivsete ribosoomide hulga määramiseks kasutati puromütsiini mudelreaktsiooni (Traut ja Monro 1964). Reaktsioonisegu A [25 μ l iga paraloogi kohta: 2 pmol/ μ l NAc[³H]Phe; 3 μ g pU lahustatuna 1x polümix puhvris; 10 pmol 50S; 15 pmol 30S; 1x polümix puhver (5 mM MgOAc; 0,5 mM CaCl; 5 mM NH₄Cl; 95 mM KCl; 8 mM putrestsiin; 1 mM spermidiin)] inkubeeriti 15 min 37° C. Paraloogtüvedest eraldatud 50S segati metsiktüüpi 30S alaühikutega. Reaktsioon alustati 4 μ l puromütsiini lisamisega proovidele ning reaktsioonisegu inkubeeriti 30 min 37° C. Reageerimata NAc[³H]Phe-tRNA hüdrolüüsiti 3,8 μ l 10 M KOH-iga inkubeerides 20 min 42° C. Proovidele lisati pH neutraliseerimiseks 1 M Hepes pH 7,0 puhvrit. Puromütsiin-NAc[³H]Phe ekstraheeriti 1 ml etüülatsetaadiga (EtAc) intensiivselt segades (5 min väristajal, seejärel eraldati erinevad faasid tsentrifuugides 2 min 13 000 rpm). Etüülatsetaadi faasist eraldati 500 μ l ja viimasest loendati sisalduv radioaktiivne puromütsiin-NAc[³H]Phe kasutades PerkinElmeri Tri-Carb 2800TR stsintsillatsiooni lugejat.

2.2.6. Alaühikute valgusünteesi võime kontrollimine polü(U) süsteemis

Valgusünteesi võimet kontrolliti *in vitro* polü(U)-sõltuvas polüPhe translatsiooni katses (Dohme ja Nierhaus 1976) kõigi paraloogide ja metsiktüüpi ribosoomidega. Katse tarbeks segati kokku kaks reaktsioonisegu: A [150 μ l: 10 pmol 50S; 15 pmol 30S; 9 μ g pU lahustatuna 1x polümix puhvris; 3 pmol/ μ l NAc[³H]Phe; 1x polümix puhver (5 mM MgOAc; 0,5 mM CaCl; 5 mM NH₄Cl; 95 mM KCl; 8 mM putrestsiin; 1 mM spermidiin)] ja B [150 μ l: 1x Polümix puhver; 200 mM Hepes pH 7,6; 1 mM DTE; 0,23 U/ μ l BULK tRNA; 1 mM ATP; 0,5 mM GTP; 10 mM PEP; 665 pmol [¹⁴C]-Phe; 30 nmol Phe; 0,9 μ l PK; 0,6 μ l PheRS-C; 3 μ l EF-Tu; 3 μ l EF-G ja 0,6 μ l EF-Ts]. Paraloogtüvedest eraldatud 50S segati metsiktüüpi 30S alaühikutega. Segud eelinkubeeriti eraldi 15 min 37° C. Sünteesi ajal (37° C) võeti kuuel erineval ajapunktil proovid (30 μ l punktis; 15, 30, 45 ja 60 s, ning 2,5, 5 min). Sünteesireaktsioonid peatati 1,5 ml 5 % TCA-ga. RNA hüdrolüüsiti 20 min 95° C juures ning jahutati 10 min jääl. Proovid segati korralikult keeristil, filtreeriti [vaakumfiltratsioon; 1) u 5 ml 5 % TCA; 2) u 3 ml 70 % etanool] ning PerkinElmeri Tri-Carb 2800TR stsintsillatsiooni lugejaga loendati peptiidsidemesse lülitunud radioaktiivsust.

2.2.7. S12 Ekstraktide valmistamine

S12 ekstraktide valmistamiseks inokuleeriti üleöö kultuuridega 2 l modifitseeritud 2x YT söödet (+ 3,04 g/l NaH_2PO_4 ; 10,73 g/l Na_2HPO_4 ; 18 g/l glükoos) (Tae-Wan, Ho-Cheol et al. 2008). Glükoos indutseerib glükolüütiliste ensüümide sünteesi. Kultuuride OD_{A600} jäi vahetult pärast inokuleerimist 0,1 piiresse. Kultuure kasvatati 37° C loksutitel OD_{A600} 2-ni. Kasv peatati järsu jahutamisega jääl. Rakumass koguti ROTINA lauatsentrifuugis tsentrifuugides 20 min 4500 rpm. Rakud pesti 80 ml-s (1000 ml OD_{A600} 2 rakkude kohta) puhvris A (10 mM Tris-Ac pH 8,2; 14 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 60 mM K-glutamaat; 1 mM DTT; 6 mM β -ME) 3 korda. Rakumassid lüüsi 20 ml-s (1000 ml OD_{A600} 2 rakkude kohta) B puhvris (10 mM Tris-Ac pH 8,2; 14 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 60 mM K-glutamaat; 1 mM DTT) „Bertin Technologies“ „Precellys 24“ homogenisaatoris (programm: 6000 rpm; 3 x 60 s; 10 s paus protseduuride vahel). Rakukestad eraldati lüsaadist ultratsentrifuugis Ti-50 rootoriga tsentrifuugides 10 min 11 500 rpm. Supernatandist degradeeriti endogeenne mRNA 20 min 37° C juures inkubeerides. Preparatsioonid külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80° C juures.

2.2.8. 70S ribosoomide hulga määramine S12 ekstraktis

70S ribosoomide hulga määramiseks kanti 500 μl iga paraloogi S12 ekstrakti 10 – 30 % sahharoosi gradiendile (1x Overlay-10) ning alaühikute fraktsioneerimine viidi läbi ultratsentrifuugis SW-28 rootoriga tsentrifuugides $\omega^2 t = 2,7 \times 10^{11} \text{ rad}^2/\text{s}$, 4° C. Fraktsioonid visualiseeriti läbivoolu-spektrofotomeetri ($A_{260\text{nm}}$), peristaatilise pumba ja isekirjutaja abil. Sahharoosi gradiendist koguti ribosoomide 70S fraktsioon. Fraktsioonis olevate ribosoomide kvantifitseerimiseks mõõdeti lahuse optiline tihedus ($A_{260\text{nm}}$) ning arvutati 70S kogus pmol-des.

2.2.9. Valgusünteesi kiiruse mõõtmine S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis

Valgusünteesi kiiruse mõõtmiseks S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis kasutati kõikide paraloogide ja metsiktüüpi tüve S12 rakuekstrakti. Ühe katseseeria (9 ajapunkti; 35 μl punkt) jaoks võeti S12 rakuekstrakti 7x mahus (230 μl) ning B segu [S12 mastermix (240 mM Hepes-KOH pH 8,2; 20 mM K-Fosfaat pH 7,2; 90 mM K-Glutamaat pH 7,7; 60 mM Glükoos; 80 mM NH_4OAc ; 8 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 2 % PEG-4000; 1 mM THF; 1,2 mM ATP; 0,85 mM CTP; 0,85 mM GTP; 0,85 mM UTP); 500 μM aminohapete segu (Roche „RTS Aminoacid Sampler“; 8,4 mM kõiki aminohappeid); 48 μg FLUC mRNA] samuti 7x mahus (147 μl). S12 rakuekstrakt ja B segu eelinkubeeriti eraldi segajal 5 min 37° C. Valgusüntees toimus 37° C juures segaja-inkubaatoril (BioSan) vältimaks reaktsioonisegu komponentide sadenemist. Valgusünteesi käigus võeti üheksal erineval ajapunktil proovid (35 μl punkt; 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 210 ja 240 s). Sünteesi reaktsioonid peatati 15 μl klindamütsiini

lahusega (300 µg klindamütsiini). FLUC valgu poolestusaeg on *in vitro* väga lühike, umbes 5 minutit, seetõttu külmutati proovid koheseselt vedelas lämmastikus. 96-süvendiga mikroplaadile kanti iga proovi jaoks 100 µl PROMEGA LUC reagenti (reagendi kogus määratud PROMEGA „Luciferase Assay System“ protokollis). Reagentidele lisati pärast proovide 5 minutilist sulamist viie sekundilise intervalliga 25 µl vastavast proovist. Ajapunktidel tekkinud luminesentsi väärtused mõõdeti kolmes korduses TECAN Infinite M200 Pro plaadilugejaga.

2.3. Tulemused ja arutelu

Kontrollimaks hüpoteesi, mille kohaselt valgusünteesi kiirus sõltub sellest, millist L31 ja/või L36 valguparaloogi ribosoom sisaldab, viidi läbi katseseeriad, milles analüüsiti erinevaid L31 ja L36 paralooge sisaldavate ribosoomipopulatsioonide valgusünteesi võimet *in vitro*. Töös kasutati kahte erineva kompleksuse astmega, kuid teineteist täiendavat *in vitro* katsesüsteemi: polü(U)- ning S12-sõltuvat translatsioonisüsteemi.

Polü(U)-sõltuva polü(Phe) sünteesi süsteem koosneb eksperimentaatori poolt määratud vahekordades kokku segatud, polü(U)-sõltuvaks polü(Phe) sünteesiks minimaalselt vajalikust hulgast eelnevalt puhastatud valgusünteesiaparaadi komponentidest. Lisaks ribosoomi alaühikutele ning mRNA ja tRNA substraatidele sisaldab nn. „polü(U)“ süsteem veel elongatsioonifaktoreid ning elongatsiooniks vajaliku GTP regenereerimise süsteemi. Võrreldes S12-süsteemiga on „polü(U)“ süsteem seetõttu vähem kompleksne ning kuna siin kasutatakse ilma initsiatsioonifaktoriteta eelformeeritud 70S initsiatsioonikompleksi, peegeldab polü(U) katses konkreetse ribosoomivariandi poolt sünteesitud polü(Phe) hulk eelkõige selle ribosoomivariandi võimet protsessiivseks elongatsiooniks homopolümeersel mRNA-l.

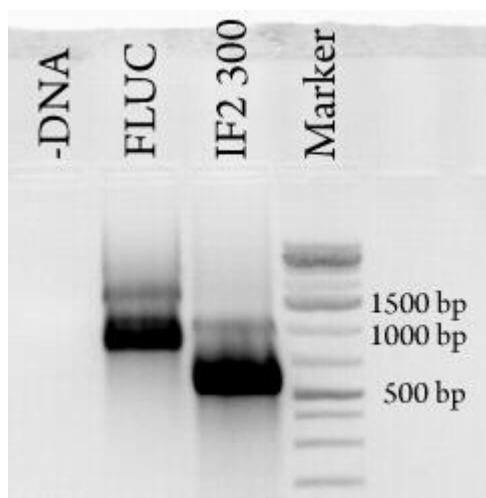
„Polü(U)-ga“ võrreldes kompleksem S12-sõltuv translatsioonisüsteem võimaldab hinnata valgusünteesi võimet elulähedasemas situatsioonis, kuna süsteemis kasutatav S12 rakuekstrakt sisaldab kõiki heteropolümeerselt mRNA matriitsilt toimuvaks valgusünteesiks vajalikke komponente. Seetõttu sobib see ka funktsionaalsete produktide sünteesiks. S12-sõltuvas katses analüüsiti nii initsiatsiooni- kui elongatsioonifaasi. S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis transleeriti FLUC valk, mis katalüüsib kaheetapilist reaktsiooni: 1) lutsiferiin + ATP → lutsiferüül adenülaat + PP_i; 2) lutsiferüül adenülaat + O₂ → oksülutsiferiin + AMP + valgus. Teises reaktsioonietapis ergastatud olekusse läinud oksülutsiferiin liigub tagasi põhiolekusse ning selle ülemineku käigus vabaneb footon luminesentsiks nimetatavas protsessis. Sünteesitud funktsionaalse FLUC valgu kogust kvantifitseeritakse tema ensümaatilise aktiivsuse kaudu mõõtes tekkinud luminesentsi hulka.

2.3.1. Katsesubstraatide süntees ja preparatiivne eraldamine

FLUC mRNA preparatiivne süntees. Ribosoomide aktiivsuse iseloomustamiseks S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis kasutati mRNA matriitsina *Photinus pyralis*-e ensüümi lutsiferaas kodeerivat mRNA-d (ingl *Firefly luciferase*; *FLUC*). FLUC on monomeerne valk, mis saavutab funktsionaalsuse kohe peale translatsiooni lõppemist. Kõik need omadused

teevad FLUC-st tundliku reportervalgu, mis on sobiv ribosoomide aktiivsuse jälgimiseks nii translatsiooni initsiatsiooni kui elongatsioonifaasis.

FLUC mRNA preparatiivse koguse saamiseks amplifitseeriti FLUC DNA matriits *in vitro* transkriptsiooni jaoks pIVEX2.3-MCS plasmiidilt PCR meetodiga. PCR meetod sobib teatud hulga DNA amplifitseerimiseks, kuna see on kiire (näiteks puudub rakulüüsi etapp, sest rakke pole plasmidi paljundamiseks vaja) ning algmaterjali kulub vähe. mRNA sünteesiti DNA matriitsilt *in vitro* T7 polümeraasi transkriptsioonisüsteemis. Tulemuseks saadi preparatiivne kogus funktsionaalset ja kvaliteetset FLUC mRNA-d (transkribeeritud RNA on homogeenne ja liigub geelis sisuliselt ühe vöödina), mida hiljem kasutati matriitsina S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis reportervalgu sünteesiks. (joonis 6)



Joonis 6. FLUC mRNA analüüs 1,5 % agarosgeelil. FLUC mRNA pikkus on 1652 nukleotiidi. IF2 300 on 900 nukleotiidi pikkune mRNA matriits, mida kasutati kontrollproovina. Markeriks oli Generuler™ 1 kb DNA Ladder Plus.

Ribosoomi alaühikute eraldamine. Ribosoomi alaühikute (L31/L36 paraloogide ja metsiktüve) üldise valgusünteesi võime hindamiseks polü(U)-sõltuvas translatsioonisüsteemis eraldati vastavatest tüvedest 50S ja 30S alaühikud. Alaühikute eraldamisel lähtuti rakulüsaadist läbi 20 % sahharoosilahuse tsentrifuugimise teel saadud 70S ribosoomide preparatsioonist.

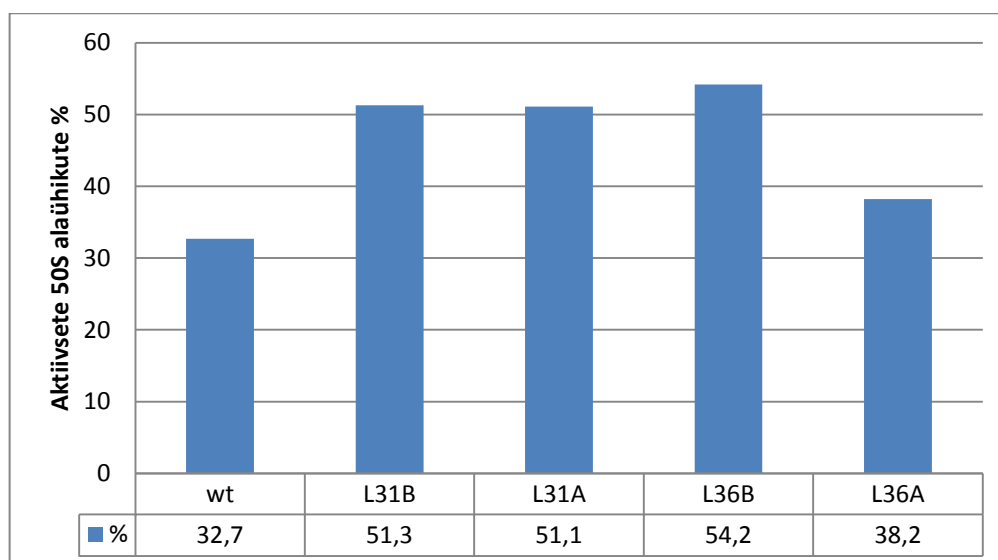
2.3.2. Aktiivsete alaühikute hulga määramine

Aktiivsete 50S alaühikute protsendi määramiseks 50S preparatsiooni koguhulgast kasutati puromütsiini mudelreaktsiooni. (Traut ja Monro 1964) Puromütsiini katse iseloomustab

ribosoomide võimet katalüüsida peptidüültransferaasset reaktsiooni A-saiti seondunud puromütsiini ja P-saiti seondunud $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ vahel. Kuna puromütsiin sarnaneb oma struktuuri ja reaktiivsuse poolest aminoatsüleeritud tRNA 3' otsaga, katalüüsib 50S alaühikus paiknev peptidüültransferaasne tsenter puromütsiini ülekannet P-saidis asuvale $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ -le analoogiliselt autentse aminoatsüül-tRNA substraadiga toimuvale reaktsioonile. Tekib nn „surnud ots“, kust valgusüntees edasi ei lähe. Et tekkinud $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Phe}$ -puromütsiini hulk on sõltuvuses peptidüültransferaasset reaktsiooni katalüüsida suutvate 50S alaühikute hulgast, on puromütsiini reaktsioon heaks vahendiks aktiivsete 50S alaühikute osakaalu määramiseks preparatsioonis.

Eksperimendi käigus eelinkubeeriti reaktsioonisegu (vt ptk 2.2.5) 15 min 37°C . Katses eeldati, et kõigi variantide puhul seondus preinkubatsiooni käigus aktiivsete ribosoomide P-saiti ühesugune kogus $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ -d, moodustades seal $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ -polü(U)-70S kompleksi. Pärast eelinkubatsiooni lisati reaktsioonisegusse puromütsiin, mis seondub ribosoomis A-saiti ja reageerib P-saidis oleva $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ -ga. Segu inkubeeriti 30 minutit 37°C ja peatati 10 M KOH-ga. KOH kasutati RNA hüdrolüüsiks. Proovide pH neutraliseeriti 1 M Hepes pH 7.0 puhvriga, puromütsiin- $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Phe}$ kompleks ekstraheeriti etüülatsetaadiga. Funktsionaalse PTC-ga ribosoomide hulk võrdsustati puromütsiin- $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Phe}$ kogusega, sest eelduste kohaselt oli puromütsiin- $\text{NAC}[^3\text{H}]\text{Phe}$ ning aktiivsete ribosoomide moolsuhe 1.

Katse tulemusena leiti, et peptidüültransferaasselt aktiivsete ribosoomide protsent on L31A, L31B ja L36B korral üle 50, L36A korral jääb aktiivsete ribosoomide protsent 40 alla (joonis 7). Üldjuhul on sellise meetodiga eraldatud aktiivsete 50S alaühikute hulk 30 – 50 % vahel (Dr. Liiv – suuline informatsioon). Järelikult ei mõjuta erinevate paraloogide esinemine peptiidsideme sünteesi. Võrreldes metsiktüüpi ribosoomidega oli L31A/B ning L36B 50S alaühikute preparatsioonides aktiivseid alaühikuid keskmiselt 1,6 korda rohkem. L36A 50S preparatsioonis oli aktiivseid alaühikuid 1,2 korda rohkem. Aktiivsete ribosoomide hulga kõikumine on siin ilmselt preparatsioonist sõltuv. (joonis 7)



Joonis 7. Aktiivsete 50S alaühikute % 50S preparatsioonides. 25 µl reaktsioonisegu [2 pmol/µl NAc^{[3]H}Phe; 3 µg pU lahustatuna 1x polümix puhvril; 10 pmol 50S; 15 pmol 30S; 1x polümix puhver (5 mM MgOAc; 0,5 mM CaCl; 5 mM NH₄Cl; 95 mM KCl; 8 mM putrestsiin; 1 mM spermidiin)] eelinkubateeriti 37° C 15 min. Paraloogtüvedest eraldatud 50S segati metsiktüüpi 30S alaühikutega. Reaktsioon alustati 4 µl puromütsiini lisamisega proovidele ning reaktsioonisegu inkubeeriti 30 min 37° C. Reageerimata NAc^{[3]H}Phe-tRNA hüdrolüüsiti 3,8 µl 10 M KOH-iga inkubeerides 20 min 42° C. Proovidele lisati pH neutraliseerimiseks 1 M Hepes pH 7.0 puhvrit. Puromütsiin-NAc^{[3]H}Phe ekstraheeriti 1 ml etüülatsetaadiga (EtAc) intensiivselt segades (5 min väristajal, seejärel eraldati erinevad faasid tsentrifuugides 2 min 13 000 rpm). Etüülatsetaadi faasist eraldati 500 µl ja viimasest loendati sisalduv radioaktiivne puromütsiin-NAc^{[3]H}Phe, kasutades PerkinElmeri Tri-Carb 2800TR stsintsillatsiooni lugejat, ning arvutati [^{3]H}Phe eriaktiivsuse baasil aktiivsete alaühikute protsent 50S preparatsioonides.

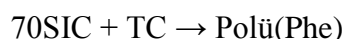
2.3.3. Alaühikute valgusünteesi võime kontrollimine polü(U)-sõltuvas translatsioonisüsteemis

Alaühikute valgusünteesi võimet analüüsiti esmalt valgusünteesi elongatsioonifaasi peegeldavas polü(U)-sõltuvas translatsioonisüsteemis. Ribosoomide protsessiivsuse hindamiseks kasutati kahte erineva isotoop-märgisega aminohapet (^{3]H}Phe ja [^{14]C]-Phe). NAc^{[3]H}Phe 3' otsa seotakse valgusünteesi käigus [^{14]C]-Phe aminohappeid ning 2 erineva aminohappe pmol suhete ajasõltuvuse analüüs võimaldab hinnata 70S ribosoomide protsessiivse elongatsiooni võimet. Reaktsioonitingimused olid disainitud sellised, kus polü(Phe) sünteesi kiirus sõltus ainult ribosoomi kontsentratsioonist, kõiki ülejäänud}}

komponente oli reaktsiooni jaoks küllastavas kontsentratsioonis (st nende kontsentratsiooni tõstmine ei toonud kaasa polü(Phe) sünteesi kiiruse kasvu). Katse käigus võeti kuuel erineval ajapunktil proovid ning PerkinElmeri Tri-Carb 2800TR stsintillatsiooni lugejaga loendati ajapunktidel radioaktiivse NAc[³H]Phe-ga algavasse peptiidahelasse lülitatud radioaktiivne [¹⁴C]-Phe. Eriaktiivsuste baasil arvutati välja [¹⁴C]-Phe/NAc[³H]Phe pmol suhe. Andmed analüüsiti mittelineaarse regressiooni avaldisega

$$Y = Y_0 + (Platoo - Y_0) * (1 - \exp(-K * x)) \quad (1)$$

Selline produkti vabanemise ajasõltuvus kehtib järgneva reaktsiooniskeemi korral:

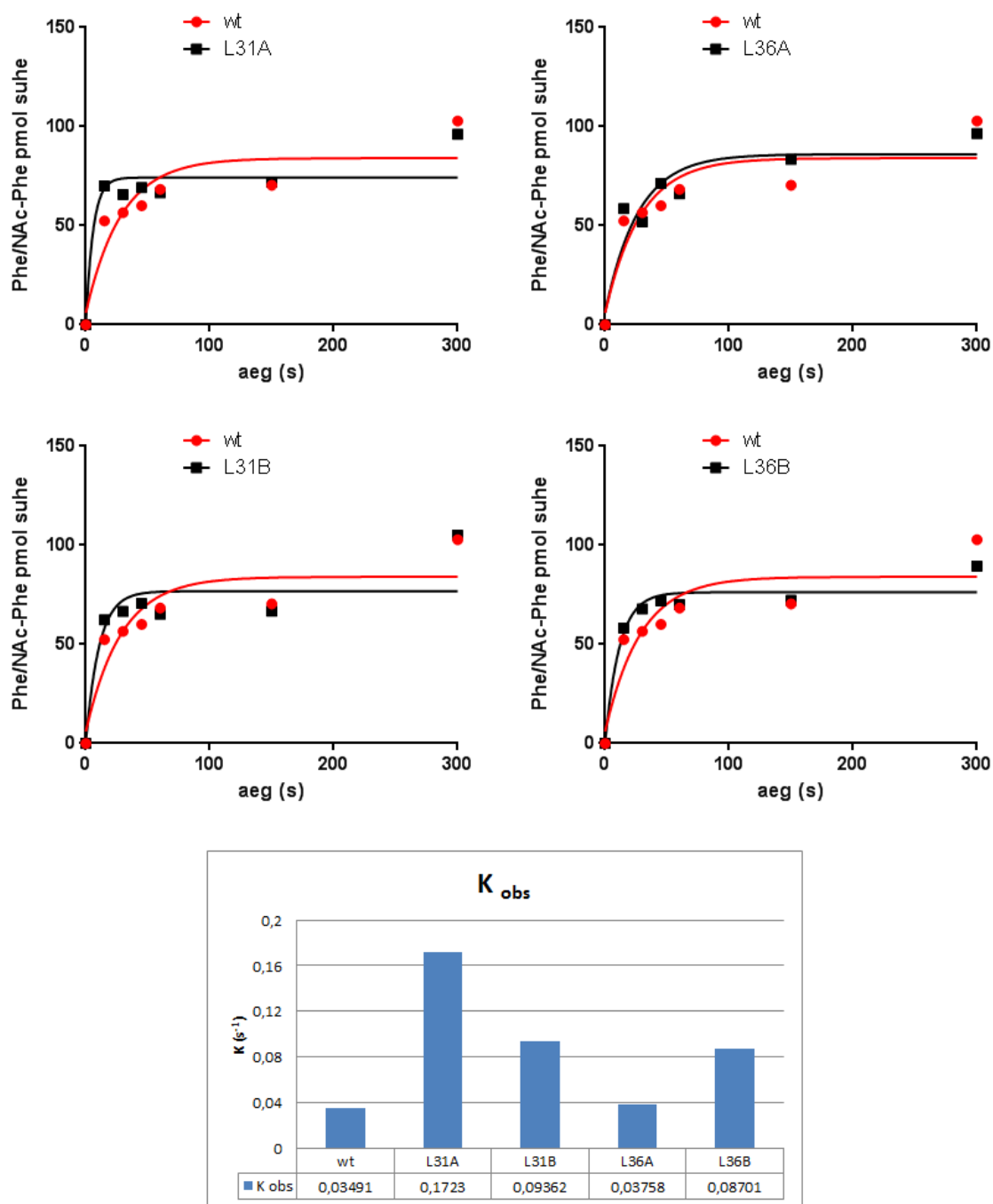


70SIC tähistab polü(U) mRNA ja NAc[³H]Phe-tRNA-ga programmeeritud initsiatsioonikompleksi ning TC [¹⁴C]Phe-tRNA-GTP-EF-Tu ternaarkompleksi. Avaldise 1 rakendamise eelduseks on, et eelkirjeldatud reaktsioon oleks pseudo esimest järku, ehk tema kiirus sõltuks ainult ühe reageeriva komponendi kontsentratsioonist. Antud katses oli limiteerivaks komponendiks 70S initsiatsioonikompleks, ternaarkompleks oli aga küllastavas kontsentratsioonis. Erinevate ribosoomivariantide elongatsioonikiirust iseloomustab sellistes tingimustes arvuliselt näiv esimest järku kiiruskonstant K_{obs} , mille väärtused leiti katseandmete mittelineaarse regressiooni teel vastavalt avaldisele 1. Avaldist kasutades arvutati näivad kiiruskonstandi K_{obs} väärtused kõigi variandite kohta (joonis 8).

Suhte [¹⁴C]-Phe/NAc[³H]Phe ajasõltuvuse analüüsil määratud näiva esimest järku kiiruskonstandi K_{obs} väärtusi arvestades toimub polü(U)-sõltuva polü(Phe) süntees kõige kiiremini valdavalt r-valgu L31 paralooigi A sisaldavatel ribosoomidel (joonis 8). Siinkohal olgu meeldetuletuseks mainitud, et rakus sünteesitakse r-valgu L31 paralooigi A normaalse Zn^{2+} sisalduse korral kasvukeskkonnas (Makarova, Ponomarev et al. 2001). Zn^{2+} vaeguse korral sünteesitavat L31B-d sisaldavate ribosoomide elongatsioonifaasi aktiivsus on K_{obs} väärtustest lähtudes valgu L31A sisaldavate ribosoomidega võrreldes peaaegu 2 korda madalam. Mainitud tulemus osutab sellele, et ribosoomi aktiivsus on sõltuvuses r-valgu L31 paralooigide esinemisest 50S alaühikus. R-alk L31 on perifeerne sild ribosoomi alaühikute vahel, moodustades dimeeri valguga L5 ja interakteerudes C-terminaalses otsas valkudega S13 ning S19. L31 paralooigide A või B lülitamisel ribosoomi koosseisu võidakse erinevalt mõjutada *ratchet*-laadset liikumist ja läbi selle ribosoomi töötsükli. Samuti võivad r-valgu L31 paralooigid A ja B erinevalt mõjutada ka 70S ribosoomide assotsiatsiooni ehk reaalses elus initsiatsioonifaasi. Nende kahe versiooni osas püütakse edasiste katsetega selgusele

jõuda. Versioonide paikapidavused toetaksid omakorda hüpoteesi, mille kohaselt valgu L31 ühe või teise paraloogi tase rakus ja sellest tulenev eelistatud lülitumine 50S alaühiku koostisesse võiks olla vahendiks raku kasvukeskkonnas toimuvate muutuste vahendamisel translatsiooniaparaadile.

Valgu L36 korral on ribosoomi elongatsiooniaktiivsuse sõltuvus paraloogi A või B esinemisest 50S alaühiku koostises tulemuste kohaselt vastupidine olukorrale valgu L31 paraloogidega. Nimelt näitab [^{14}C]-Phe/NAc[^3H]Phe suhte ajasõltuvuse analüüs, et r-valgu L36 paraloogi A sisaldavate ribosoomide aktiivsus elongatsioonifaasis on madalam paraloogi B sisaldavate ribosoomide aktiivsusest (joonis 8). Seega ei vahenda ilmselt L36 paraloogide esinemine kasvukeskkonna muutusi ribosoomile. Statsionaarses raku kasvufaasis valgusüntees aeglustub, kuid L36B puhul (statsionaarse faasi valk) valgusüntees hoopis kiireneb (joonis 8).



Joonis 8. [^{14}C]-Phe/NAc[3H]Phe pmol suhte ajasõltuvuse analüüs avaldise 1 põhjal. B joonisel on näivad esimest järku kiiruskonstandid arvutatud regressiooni avaldise 1 kaudu. 150 μ l reaktsioonisegud A [10 pmol 50S; 15 pmol 30S; 9 μ g pU lahustatuna 1x polümix puhvris; 3 pmol/ μ l NAc[3H]Phe; 1x polümix puhver (5 mM MgOAc; 0,5 mM CaCl; 5 mM NH $_4$ Cl; 95 mM KCl; 8 mM putrestsiin; 1 mM spermidiin)] ja B [1x polümix puhver; 200 mM Hepes pH 7.6; 1 mM DTE; 0,23 U/ μ l BULK tRNA; 1 mM ATP; 0,5 mM GTP; 10 mM PEP; 665 pmol [^{14}C]-Phe; 30 nmol Phe; 0,9 μ l PK; 0,6 μ l PheRS-C; 3 μ l EF-Tu; 3 μ l EF-G ja 0,6 μ l EF-Ts] eelinkubeeriti 15 min 37° C. Paraloogtüvedest eraldatud 50S segati metsiktüüpi 30S alaühikutega. Sünteesi ajal (37° C) võeti kuuel erineval ajapunktil proovid (30 μ l punktis; 15,

30, 45 ja 60 s, ning 2,5, 5 min). Sünteesireaktsioonid peatati 1,5 ml 5 % TCA-ga. RNA hüdrolüüsiti 20 min 95° C juures ning jahutati 10 min jääl. Proovid segati korralikult keeristil, filtreeriti [vaakumfiltratsioon; 1) u 5 ml 5 % TCA; 2) u 3 ml 70 % etanool] ning PerkinElmeri Tri-Carb 2800TR stsintillatsiooni lugejaga loendati peptiidsidemesse lülitunud radioaktiivsus.

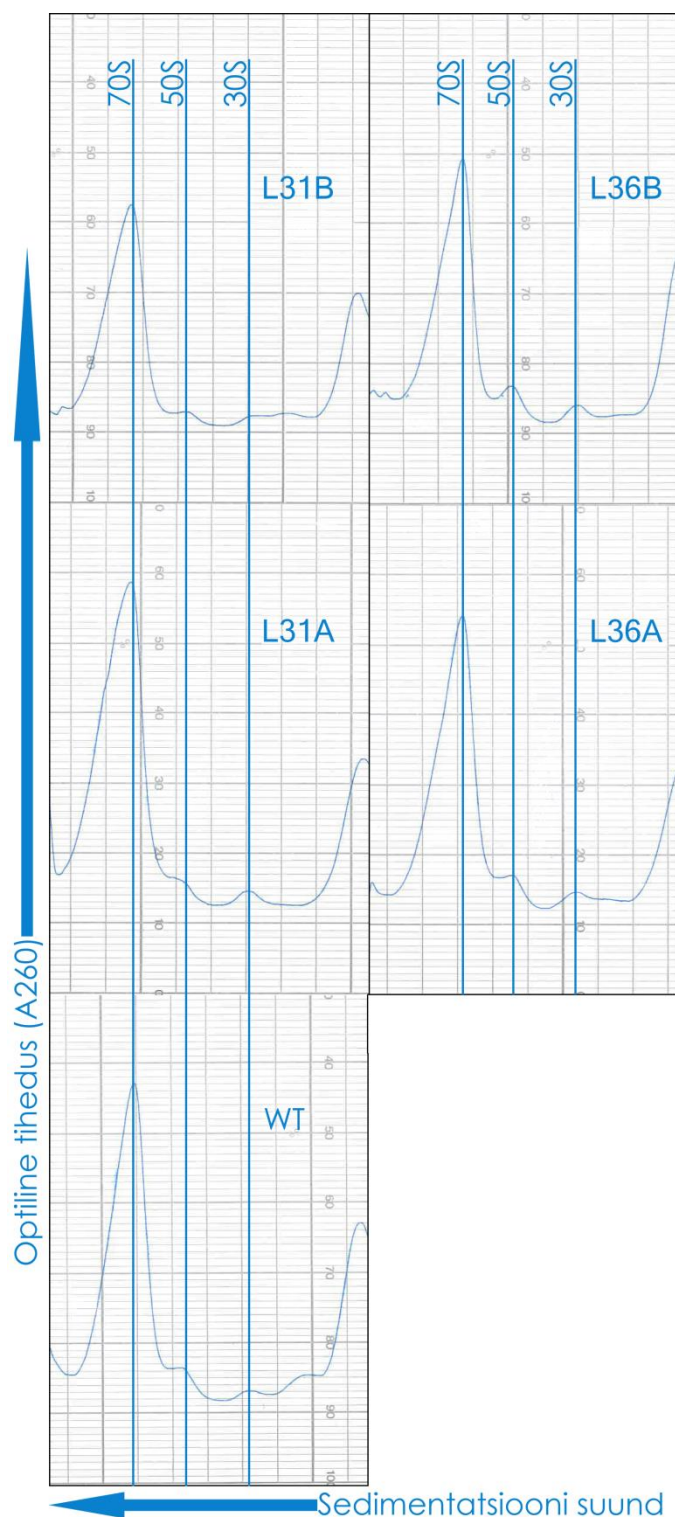
2.3.4. Valgusünteesi kiiruse mõõtmine S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis

Ribosoomide valgusünteesi võime iseloomustamiseks S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis kasutati *Photinus pyralis*-i ensüümi lutsiferaas kodeerivat mRNA-d (ingl *Firefly luciferase*; *FLUC*). Lutsiferaas katalüüsib kaheetapist reaktsiooni: 1) lutsiferiin + ATP → lutsiferüül adenülaat + PPi; 2) lutsiferüül adenülaat + O₂ → oksülutsiferiin + AMP + valgus. Reaktsioonietapis 2 ergastatud olekusse läinud oksülutsiferiin liigub tagasi põhiolekusse ning selle ülemineku käigus vabaneb footon luminesentsiks nimetatavas protsessis. (Gould ja Subramani 1988) Sünteesitud funktsionaalse FLUC valgu kogust kvantifitseeritakse tema ensümaatilise aktiivsuse kaudu – mõõdetakse reaktsiooni käigus eralduvate footonite hulka luminomeetriselt. S12-sõltuvat translatsioonisüsteemi kasutati valgusünteesi initsiatsiooni- ja elongatsioonifaasi analüüsiks. Kuna normaalsetes kasvutingimustes katalüüsivad ribosoomid valgusünteesi maksimaalse kiirusega (ligikaudu 16 polümerisatsiooni sündmust sekundis), sobib FLUC reportervalguna ideaalselt. Funktsionaalse FLUC valgu sünteesiks kulub ribosoomil maksimaalse kiiruse korral ligikaudu 35 s (+ initsiatsiooniks kuluv aeg), mistõttu saab ribosoomide elongatsioonifaasi hinnata juba mõne minuti jooksul.

Katsetulemuste normaliseerimiseks ja omavahel võrdlemiseks hinnati 70S ribosoomide üldhulka S12 rakuekstraktides. Seeläbi hinnati kaudselt ka aktiivsete ribosoomide hulka. 500 µl iga paraloogi S12 ekstrakti kanti 10 – 30 % sahharoosi gradiendile (1x Overlay-10) ning 70S ribosoomid eraldati ultratsentrifuugis SW-28 rootoriga $\omega^2 t = 2,7 \times 10^{11} \text{ rad}^2/\text{s}$, 4° C. Fraktsioonid visualiseeriti läbivoolu-spektrofotomeetri (A_{260nm}), peristaatilise pumba ja isekirjutaja abil. (joonis 9). 70S fraktsioonide kontsentratsioonid mõõdeti Nanodrop spektrofotomeetriga katsetulemuste normaliseerimiseks (tabel 3). 70S üldhulga määramisvajaduse tingis ka asjaolu, et S12 rakuekstrakte tehes kasutati puhversüsteemina K-Glutamaati, erinevalt üldkasutatavatest süsteemidest (näiteks Tris(Hepes)-sool-Mg puhversüsteem). Gradiendi analüüs näitas, et põhiosa S12 rakuekstraktide alaühikutest oli 70S fraktsioonides (joonis 9).

Tabel 3. 70S ribosoomide kontsentratsioon S12 rakuekstraktides. 70S fraktsioonis olevate ribosoomide kvantifitseerimiseks mõõdeti lahuse optiline tihedus ($A_{260\text{nm}}$) ja teisendati pmol/ μl -ks.

S12 ekstrakt	70 S pmol/ μl
wt	3,36
L31B	2,07
L31A	3,40
L36B	1,99
L36A	2,78



Joonis 9. S12 rakuekstraktide analüüs 10 – 30 % sahharoosi gradiendis (1x Overlay-10). Gradiendid tseentrifuugiti ultratsentrifuugis SW-28 rootoriga $\omega^2 t = 2,7 \times 10^{11} \text{ rad}^2/\text{s}$, 4° C. Fraktsioonid visualiseeriti läbivoolu-spektrofotomeetri ($A_{260\text{nm}}$), peristaatilise pumba ja isekirjutaja abil.

S12-sõltuv translatsioonisüsteem koosnes S12 lüsaadist ja B segust (S12 mastermix, 500 μM aminohapete segu ja 48 μg FLUC mRNA; vt ptk 2.2.9). Segusid eelinkubeeriti 5 min 37° C,

seejärel segati kokku ja üheksal erineval ajapunktil võeti proovid. Valgusüntees peatati klindamütsiini lahusega (300 µg klindamütsiini). Klindamütsiin inhibeerib valgusünteesi takistades ribosomaalset translokatsiooni 50S alaühikuga seondumise kaudu (klindamütsiini optimaalne töökonsentratsioon oli eelnevalt määratud K. Kipper poolt). Proovid külmutati koheselt vedelas lämmastikus. Nimetatud protseduuriga oli vajalik tagamaks, et eri ajapunktidel võetud proovides oleks luminesentsi mõõtmise hetkeks lutsiferaasi reaktsioon kulgenud ühesuguses ulatuses. Täpsemate andmete saamiseks jälgiti, et proove LUC reagentidele (PROMEGA) kandes oleks toatemperatuuril olnud aeg kõigil proovidel võrdne (5 minutit sulamist, 5 sek intervallina). Mõõdeti tekkinud luminesentsi hulga 25 µl-s proovides ja tulemus arvutati 1 pmol ribosoomide kohta (joonis 10).

Mõõtmistulemused näitasid, et r-alkude L31 ja L36 paraloogidel puudub valgusünteesi võimes võrreldes metsiktüüpi ribosoomidega igasugune eelis. Kõik testitud paraloogid sünteesivad funktsionaalset FLUC valku vähem kui metsiktüüpi ribosoomid (joonis 10). See justkui viitaks asjaolule, et r-alkude L31 ja L36 erinevad paraloogid avaldavad valgusünteesi võimele erinevat mõju.

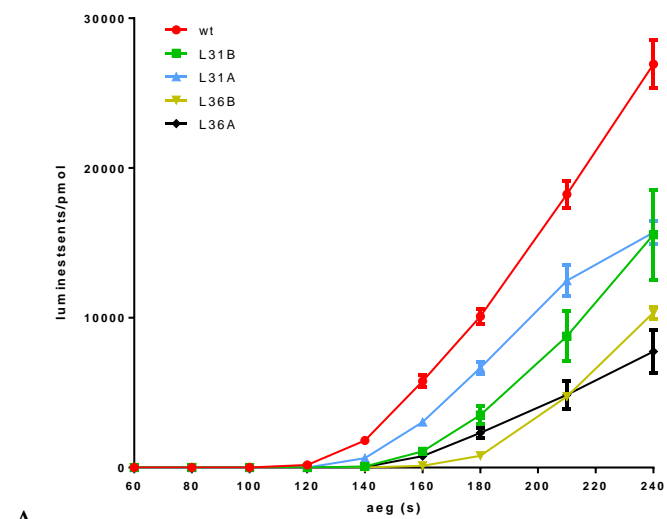
Joonis 10B graafikul on näidatud esimest viite ajapunkti, initsiatsiooni faasi ja elongatsioonile üleminekut. Initsiatsioonifaasis toimub ribosoomi 70S kompleksi moodustumine mRNA matriitsile. Metsiktüüpi tüve rakuekstraktis on initsiatsioonifaasi kestus vaieldamatult kõige lühem (luminesentsi signaal on detekteeritav varem, kui teistel). Paraloogide võrdluses kestab L31A valku sisaldavate ribosoomide initsiatsioonifaas vähem aega, kui tema paraloogi L31B-d sisaldavatel ribosoomidel. See näib viitavat asjaolule, et olenevalt kindla paraloogi esinemisest ribosoomis, muutub valgusünteesi võime initsiatsioonifaasis.

R-alk L31 moodustab alaühikutevahelise perifeerse B1b silla ja võib valgusüntessi võimet mõjutada 1) alaühikute assotsiatsiooni (initsiatsioonifaas) või 2) *ratchet*-liikumise kaudu (elongatsioonifaas). Katseandmete põhjal võib oletada, et esimesel juhul assotsieeruvad alaühikud 70S ribosoomiks võimekamalt L31A olemasolul ribosoomis ning kehvemalt, kui B1b silla koosseisu kuulub L31B. Samuti võib oletada, et *ratchet*-laadset liikumist mõjutab pärssivamalt L31B olemasolu ribosoomis, sest L31A-d sisaldavad ribosoomid sünteesivad mõõdetud ajapunktidel 2 korda rohkem funktsionaalset valku kui L31B-d sisaldavad ribosoomid (joonis 10).

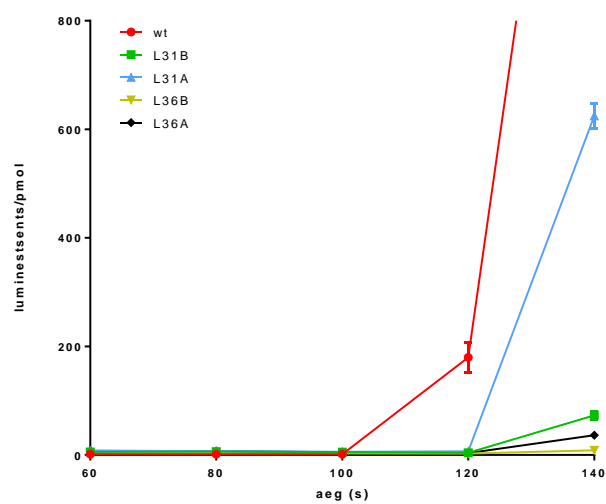
R-alku L36 paraloogide puhul on initsiatsioonifaasis aktiivsemad paraloog A-d sisaldavad ribosoomid, mida samuti sünteesitakse rakus normaalse Zn^{2+} kontsentratsiooni korral kasvukeskkonnas. Elongatsioonifaas kulgeb paraloog A-d sisaldavatel ribosoomidel aga

aeglasemalt kui L36B paraloogiga ribosoomidel. B paraloogi sisaldavad ribosoomid on elongatsioonifaasis stabiilsemad ja nende aktiivsus on võrdeline L31 paraloogide aktiivsustega, kuid L36A paraloogiga ribosoomid kaotavad elongatsioonifaasis kiirust.

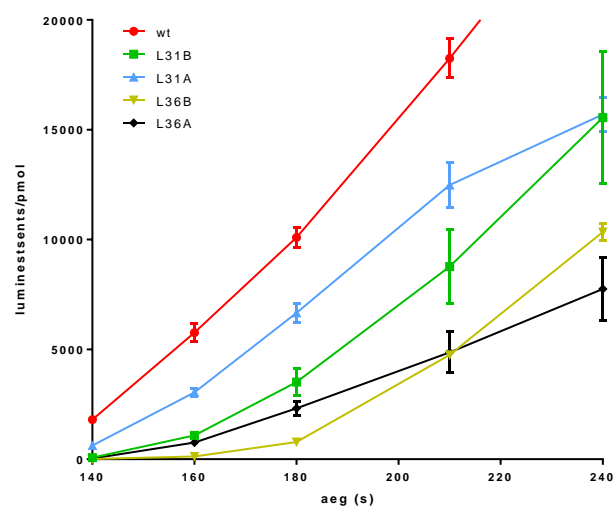
R-valk L36 üheks funktsiooniks peetakse 23S RNA ruumilise struktuuri stabiliseerimist (Maeder ja Draper 2005). Läbi selle võivad r-valgu L36 erinevad paraloogid mõju avaldada nii valgusünteesi initsiatsioonile kui ka elongatsioonile. Katseandmetest tulenevalt võib oletada, et L36A paraloogi olemasolu ribosoomides pärsib ribosoomi valgusünteesi rohkem kui L36B valgu olemasolu (L36B-d sisaldavate ribosoomide graafiku tõus on teravam kui L36A-d sisaldavatel ribosoomidel; joonis 10).



A



B



C

Joonis 10. Valgusünteesi kiiruse mõõtmine funktsionaalse FLUC valgu sünteesi järgi S12-sõltuvas translatioonisüsteemis. S12 rakuekstrakt ja B segu eelinkubeeriti eraldi segajal 5 min 37° C. Valgusüntees toimus 37° C juures segajal ja selle käigus võeti üheksal

erineval ajapunktil proovid (35 µl punkt; 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 210 ja 240 s). Sünteesi reaktsioonid peatati 15 µl klindamütsiini lahusega (300 µg klindamütsiini). Proovid külmutati koheselt vedelas lämmastikus. 96-süvendiga mikroplaadile kanti iga proovi jaoks 100 µl PROMEGA LUC reagenti ning reagentidele lisati pärast proovide 5 minutilist sulamist viie sekundilise intervalliga 25 µl vastavast proovist. Tekkinud luminesentsi väärtused mõõdeti 25 µl-st proovist kolmes korduses TECAN Infinite M200 Pro plaadilugejaga.

R-valkude L31 ja L36 A paralooge sünteesitakse rakus normaalse Zn^{2+} korral kasvukeskkonnas, kui rakud on eksponentsiaalses kasvufaasis. Statsionaarses kasvufaasis lülitatakse ümber L31B ning L36B paralooogide sünteesile. R-valgu L31 puhul kinnitavad katseandmed justkui sellele, et r-valgu L31 ühe või teise paralooogi esinemine ribosoomi koostises vahendab muutusi keskkonnatingimustes valgusünteesiapaadile. R-valgu L36 korral seda tulemustes näha ei ole, sest kuigi L36 erinevate paralooogide esinemine ribosoomis mõjutab ribosoomide valgusünteesivõimet, on L36B-d sisaldavad ribosoomid valgusünteesil võimekamad L36A-d sisaldavatest ribosoomidest.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös püüti selgitada, kas r-valkude L31 ja L36 erinevate paraloogide esinemine ribosoomi koostises vahendab muutusi keskkonnatingimustes valgusünteesiapaadile, läbi püstitatud hüpoteesi kontrollimise. Hüpoteesi kohaselt sõltus valgusünteesi kiirus sellest, millist L31 ja/või L36 valguparaloogi ribosoom sisaldab. Eesmärgi saavutamiseks analüüsiti paralooge sisaldavate ribosoomide valgusünteesi võimet kahes *in vitro* valgusünteesi süsteemis: polü(U)- ja S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis.

Valgusünteesi elongatsioonifaasi peegeldava polü(U)-sõltuva translatsioonisüsteemi katsetulemused näitasid, et r-valgu L31 puhul toimub polü(U)-sõltuva polü(Phe) süntees kõige kiiremini valdavalt L31 paraloogi A (süntees normaalse Zn^{2+} sisalduse korral kasvukeskkonnas) sisaldavatel ribosoomidel. L31B-d (süntees Zn^{2+} vaeguse korral) sisaldavate ribosoomide elongatsioonifaasi aktiivsus on peaaegu 2 korda madalam. Valgu L36 korral on L36 paraloogi A (süntees normaalse Zn^{2+} sisalduse korral kasvukeskkonnas) sisaldavate ribosoomide aktiivsus elongatsioonifaasis madalam B paraloogi (süntees Zn^{2+} vaeguse korral) sisaldavate ribosoomide aktiivsusest.

S12-sõltuvas translatsioonisüsteemis näitasid mõõtmistulemused, et r-valkude L31 ja L36 paraloogidel puudub valgusünteesi võimes võrreldes metsiktüüpi ribosoomidega igasugune eelis. R-valgu L31 paraloogide võrdluses kestab L31A valku sisaldavate ribosoomide initsiatsioonifaas vähem aega, kui tema paraloogi L31B sisaldavatel ribosoomidel, samuti on L31A-d omavad ribosoomid elongatsioonifaasis aktiivsemad L31B-d omavatest. R-valgu L36 paraloogide puhul on initsiatsioonifaasis aktiivsem paraloog A-d sisaldavad ribosoomid. Elongatsioonifaas kulgeb paraloog A-d sisaldavatel ribosoomidel aga aeglasemalt kui L36B-d sisaldavatel ribosoomidel.

Katseandmed kinnitavad püstitaud tööhüpoteesi, mille kohaselt valgusünteesi kiirus sõltub sellest, millist L31 ja/või L36 valguparaloogi ribosoom sisaldab. R-valgu L31 puhul viitavad tulemused ka sellele, et r-valgu L31 ühe või teise paraloogi esinemine ribosoomi koostises vahendab muutusi keskkonnatingimustes valgusünteesiapaadile. R-valgu L36 korral seda katsetulemuses näha ei ole, sest kuigi L36 erinevate paraloogide esinemine ribosoomis mõjutab ribosoomide valgusünteesivõimet, on L36B-d sisaldavad ribosoomid valgusünteesil võimekamad L36A-d sisaldavatest ribosoomidest.

Functions of *Escherichia coli* ribosomal protein L31 and L36 paralogues in protein synthesis

Rain Hindrimäe

Summary

Ribosome is a large ribonucleoprotein particle responsible for protein synthesis in every living cell. Bacterial ribosomes consist of two subunits of unequal size: 30S and 50S. Bacterial ribosomes consists of three RNA molecules, namely the 16S RNA in the small subunit, in addition to the 23S RNA and the 5S RNA in the large subunit. There are 21 ribosomal proteins (S1 – S21) in the small and 34 proteins (L1 – L34) in the large subunit.

In general, r-proteins are very basic suggesting that a general function of r-proteins may be to counteract the negative charges of the phosphate residues in the rRNA backbone. Some r-proteins have a clear and essential function in the assembly of ribosomal subunits. In prokaryotes, the genes for most ribosomal proteins are clustered in several highly conserved operons. Duplications of ribosomal-protein genes are infrequent, however, several paralogous pairs of ribosomal protein genes have been identified.

The aim of the present study is to analyse possible effects of r-proteins L31/L36 paralogous pairs to the translational machinery. To accomplish the aim different paralogues containing ribosomes were tested in two *in vitro* protein synthesis systems: poly(U)- and S12-dependent translational systems.

It was found that ribosomes consisting L31A/L36A (synthesized during exponential growth) have shorter translation initiation phase than their respective paralogues. In the elongation phase, ribosomes with L31A were more active than with L31B (synthesized in stationary phase) and ribosomes with L36B were more active than with L36A.

It is therefore shown that L31/L36 paralogous pairs have different impacts to the protein synthesis. Relying on the findings, it is proposed that switching different L31 paralogues into the ribosome may be the mediator of the changes of the environment to the translational machinery.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajaid Kalle Kipperit ja Aivar Liivi kannatlikkuse, abivalmiduse ja väärtuslike nõuannete eest käesoleva töö koostamisel. Tänan meeldivaid õppejõude, kelle panus minu haridusse ja haritusse võimaldas käesoleva töö koostada.

KASUTATUD KIRJANDUS

Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. Moore ja T. Steitz (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution." *Science* (New York, N.Y.) 289(5481): 905-920.

Cukras, A. ja R. Green (2005). "Multiple effects of S13 in modulating the strength of intersubunit interactions in the ribosome during translation." *Journal of molecular biology* 349(1): 47-59.

Cummings, L., L. Riley, L. Black, A. Souvorov, S. Resenchuk, I. Dondoshansky ja T. Tatusova (2002). "Genomic BLAST: custom-defined virtual databases for complete and unfinished genomes." *FEMS microbiology letters* 216(2): 133-138.

Dohme, F. ja K. Nierhaus (1976). "Total reconstitution and assembly of 50 S subunits from *Escherichia coli* Ribosomes in vitro." *Journal of molecular biology* 107(4): 585-599.

Frank, J. ja R. Agrawal (2000). "A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation." *Nature* 406(6793): 318-322.

Gao, H., J. Sengupta, M. Valle, A. Korostelev, N. Eswar, S. Stagg, P. Van Roey, R. Agrawal, S. Harvey, A. Sali, M. Chapman ja J. Frank (2003). "Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement." *Cell* 113(6): 789-801.

Gould, S. ja S. Subramani (1988). "Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology." *Analytical biochemistry* 175(1): 5-13.

Horan, L. ja H. Noller (2007). "Intersubunit movement is required for ribosomal translocation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(12): 4881-4885.

Härd, T., A. Rak, P. Allard, L. Kloo ja M. Garber (2000). "The solution structure of ribosomal protein L36 from *Thermus thermophilus* reveals a zinc-ribbon-like fold." *Journal of molecular biology* 296(1): 169-180.

Maeder, C. ja D. Draper (2005). "A small protein unique to bacteria organizes rRNA tertiary structure over an extensive region of the 50 S ribosomal subunit." *Journal of molecular biology* 354(2): 436-446.

- Makarova, K., V. Ponomarev ja E. Koonin (2001). "Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins." *Genome biology* 2(9).
- Melnikov, S., A. Ben-Shem, N. Garreau de Loubresse, L. Jenner, G. Yusupova ja M. Yusupov (2012). "One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes." *Nature structural & molecular biology* 19(6): 560-567.
- Nanamiya, H., F. Kawamura ja S. Kosono (2006). "Proteomic study of the *Bacillus subtilis* ribosome: Finding of zinc-dependent replacement for ribosomal protein L31 paralogues." *The Journal of general and applied microbiology* 52(5): 249-258.
- Ong, S.-E., B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. Kristensen, H. Steen, A. Pandey ja M. Mann (2002). "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1(5): 376-386.
- Schuwirth, B., M. Borovinskaya, C. Hau, W. Zhang, A. Vila-Sanjurjo, J. Holton ja J. Cate (2005). "Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution." *Science (New York, N.Y.)* 310(5749): 827-834.
- Shasmal, M., B. Chakraborty ja J. Sengupta (2010). "Intrinsic molecular properties of the protein-protein bridge facilitate ratchet-like motion of the ribosome." *Biochemical and biophysical research communications* 399(2): 192-197.
- Spirin, A. (1968). "How does the ribosome work? A hypothesis based on the two subunit construction of the ribosome." *Currents in modern biology* 2(3): 115-127.
- Tae-Wan, K., K. Ho-Cheol, O. In-Seok ja K. Dong-Myung (2008). "A highly efficient and economical cell-free protein synthesis system using the S12 extract of *Escherichia coli*." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13.
- Traut, R. ja R. Monro (1964). "THE PUROMYCIN REACTION AND ITS RELATION TO PROTEIN SYNTHESIS." *Journal of molecular biology* 10: 63-72.
- Wilson, D. ja K. Nierhaus (2005). "Ribosomal proteins in the spotlight." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 40(5): 243-267.

Wimberly, B., D. Brodersen, W. Clemons, R. Morgan-Warren, A. Carter, C. Vornheim, T. Hartsch ja V. Ramakrishnan (2000). "Structure of the 30S ribosomal subunit." *Nature* 407(6802): 327-339.

Wittmann, H. (1982). "Structure and evolution of ribosomes." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character.* Royal Society (Great Britain) 216(1203): 117-135.

Yusupov, M., G. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. Earnest, J. Cate ja H. Noller (2001). "Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution." *Science* (New York, N.Y.) 292(5518): 883-896.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rain Hindrimäe

(sünnikuupäev: 14.03.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Escherichia coli ribosoomi valkude L31 ja L36 paraloogide roll valgusünteesil“, mille juhendajad on Kalle Kipper, PhD ja Aivar Liiv, PhD,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.13